

Különböző stressztűrőképességű
nagygombanemzetségek Kárpát-medencei
leletanyagának molekuláris azonosítása és
rendszerezése

Doktori értekezés

Készítette:
Halász Krisztián

Biológia Doktori Iskola
Vezetője: Erdei Anna DSc., MTA lev. tag, egyetemi tanár

Kísérletes Növénybiológia program
Programvezető: Szigeti Zoltán DSc., egyetemi tanár

Témavezetők:

Dr. Rácz Ilona CSc., egyetemi docens
Dr. Bratek Zoltán PhD., egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Budapest, 2008.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS.....	4
A „KIS FEHÉR <i>TUBER</i> ” FAJOK RENDSZEREZÉSÉNEK PROBLÉMÁI	9
A HAZAI <i>MELANOGASTER</i> ANYAGOK ÉS A FAJOK RENDSZEREZÉSÉNEK PROBLÉMÁI	11
A <i>HYGROCYPE</i> NEMZETSÉG JELLEMZÉSE, RENDSZEREZÉSI PROBLÉMÁI	16
CÉLKITŰZÉS	19
ANYAG ÉS MÓDSZER.....	20
A KÍSÉRLETI ANYAG ÉS A GOMBACSOPORTOK MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSÉNEK SZEMPONTJAI	20
<i>Tuber</i> nemzetség	20
<i>Melanogaster</i> nemzetség	22
<i>Hygrocybe</i> nemzetség	23
A KÍSÉRLETI ANYAG MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATÁNAK LÉPÉSEI	25
A minták előkészítése	25
DNS izolálás	25
A nukleinsav-kivonás minőségének ellenőrzése gélelektroforézissel.....	25
Géldokumentáció	26
PCR reakció	26
PCR-termék tisztítása és szekvenáló reakció	28
Szekvenciaanalízis	29
Fajszintű elválás vizsgálata	31
EREDMÉNYEK	32
<i>TUBER</i> NEMZETSÉG	32
<i>MELANOGASTER</i> NEMZETSÉG	40
<i>HYGROCYPE</i> NEMZETSÉG	43
DISZKUSSZIÓ	48
<i>TUBER</i> – ITS ALAPÚ ANALÍZIS EREDMÉNYEINEK MEGVITATÁSA	48
<i>MELANOGASTER</i> – ITS ALAPÚ ANALÍZIS EREDMÉNYEINEK MEGVITATÁSA.....	51
<i>HYGROCYPE</i> – RENDSZERTANI KATEGÓRIÁK SZERINTI ÁTTEKINTÉS ÉS AZ ITS ALAPÚ ANALÍZIS EREDMÉNYEINEK MEGVITATÁSA	53
ÖSSZEFOGLALÁS	61
SUMMARY	62
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	63
IRODALOMJEGYZÉK	64

Rövidítések jegyzéke

AFTOL	[<i>Assembling the Fungal Tree of Life</i>] nemzetközi kutatás a gombák leszármazásának felderítésére
bp	bázispár
bt	bootstrap-érték
EF1- α	transzkripció elongációs faktor 1- α
IGS	[<i>Intergenic Spacer</i>] gének közötti, fehérjét nem kódoló összekötő régió
INSDB	[<i>International Nucleotide Sequence Database</i>] Nemzetközi Nukleotidszekvencia Adatbázis
ITS	[<i>Internal Transcribed Spacer</i>] belső átíródo összekötő régió
mitLSU	[<i>mitochondrial large subunit</i>] mitokondriumban kódolt riboszomális nagy alegység
mitSSU	[<i>mitochondrial small subunit</i>] mitokondriumban kódolt riboszomális kis alegység
MP	[<i>Maximum Parsimony</i>] a „legnagyobb takarékoság” elve
NJ	[<i>Neighbor-Joining</i>] „szomszédcsatolásos” eljárás
NOR	nukleólusz organizáló régió
nt	nukleotid
nucLSU	[<i>nuclear large subunit</i>] sejtmagban kódolt riboszomális nagy alegység
nucSSU	[<i>nuclear small subunit</i>] sejtmagban kódolt riboszomális kis alegység
PCR	[<i>Polimerase Chain Reaction</i>] polimeráz láncreakció
RFLP	[<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>] hasítási fragmentumhossz polimorfizmus
RPB1-2	eukarióta RNS polimeráz II enzim 1. és 2. alegységei
rRNS	riboszomális RNS
s. l.	[<i>sensu lato</i>] tágabb értelemben
s. str.	[<i>sensu stricto</i>] szűkebb értelemben

Bevezetés

A szélsőséges környezeti adottságú élőhelyek mezőgazdasági célú hasznosítása sok esetben igen költséges, és a növénytermesztés feltételeinek megteremtéséhez leggyakrabban alkalmazott öntözés, vagy talajjavítás nem jelent megtérülő befektetést. Ezeket a területeket gyakran erdősítik, ám a fateleptetés sikerességét jelentősen befolyásolhatja a csemeték mennyiségi és minőségi mikorrhizáltsága.

Az erdőtelepítéseket – a megfelelő fafajok kiválasztása mellett – a lehető legnagyobb siker érdekében az adott területre jellemző, az adott stressztényezőkhez alkalmazkodott, vagy alkalmazkodni képes mikorrhizagomba fajokkal ésszerű megvalósítani, ami nemcsak gazdaságilag, hanem természetvédelmi szempontból is kívánatos. Ehhez feltétlenül szükséges az élőhelyek mikorrhiza-populációit alkotó gombafajok feltérképezése, a gomba és a gazdanövény kapcsolatának, valamint stressztűrő-képességük fiziológiai alapjainak és okainak megismerése.

A szélsőséges környezeti adottságú természetes élőhelyek mikorrhizagombáinak megismerésére Magyarországon jelentős sikereket felmutató eredményes vizsgálatok napjainkban is folynak több kutatócsoport részvételével, ám a feladat megoldása – volumenéből következően – még további kitartó kutatómunkát igényel.

Jelen munka során három, a változatos élőhelyekhez különböző mértékben alkalmazkodni képes nagygombanemzetség (illetve egy esetben csoport) túlnyomórészt Kárpát-medencei előfordulásainak összehasonlítását és az ITS régió szekvenciaanalízisen alapuló molekuláris azonosítását és rendszerezését végeztem el. Ezek közül az első a valódi szarvasgombák (*Tuber*) nemzetségének hálózatos spórás és világos perídiumú tagjait foglalja magába (a távoli rokon *T. magnatum*-tól eltekintve), melyek „kis fehér *Tuber*” néven ismertek és a mikorrhizaképző *Tuber* genus legváltozatosabb élőhelyeken élő és leggyakoribb csoportját alkotják. A második az ugyancsak mikorrhizás kocsonyáspöfetegek nemzetsége (*Melanogaster*), melyek élőhelyspektruma az előbbi csoportnál szűkebb. A harmadik gombanemzetség a szaprobionta nedűgombák (*Hygrocybe*) köre, melyek kifejezetten speciális élőhelyekre szorítkoznak, és a környezeti tényezők változásaihoz nehezen képesek alkalmazkodni.

Az egyes élőhelyek jellegzetes populációinak felderítése és molekuláris taxonómiai azonosítása elősegítheti megfelelően mikorrhizált, stabil telepített erdők kialakítását és a mezőgazdaságilag más módon nem hasznosítható területek természetes környezetbe történő beillesztését.

Irodalmi áttekintés

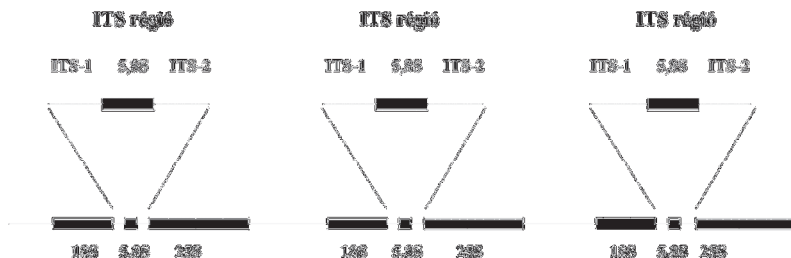
A stresszhatásnak kitett természetes élőhelyeken eredendően igen magas a mikorrhizált növények aránya, így például magas sótartalmú szikeseken, könnyen kiszáradó és felmelegedő homokon, és pangó vizes, levegőtlen úszólápokon, nehézfémekkel szennyezett bányameddőkön, stb. (Smith és Read, 1997; Augé, 2004). A mikorrhizagombák itt éppen a stressz okozta negatív hatásokat hivatottak kivédeni, többek közt a gyökér felszívó felületének növelésével, a foszfor- és nitrogénellátás fokozásával, a nehézfémek akkumulációjával és a növénybe történő bejutásuk megakadályozásával, illetve a különböző stressztényezők hatására gyakran keletkező reaktív oxigéngyökök eliminálásával.

A gomba oldaláról egyik legszélesebb körben elterjedt adaptív válasz a szárazságstresszre a spóráképzés lekerülése a talaj felszíne alá, ahol a vízpotenciál változásai kevésbé szélsőségesek. A talajfelszín alatt termőtestet képző gombákat nevezzük összefoglaló néven földalatti gombáknak. A földalatti taxonok mindegyikére jellemző a zárt termőtest, legalábbis a részlegesen záródott, szekocioid forma. Régebben a zárt termőtestű taxonokat kézenfekvő megoldásnak tűnt közös rendszertani egységbe sorolni, azonban a behatóbb kemotaxonómiai, mikromorfológiai és legutóbb a molekuláris filogenetikai vizsgálatok rávilágítottak ezeknek a gombáknak a független fejlődési vonalaira. A zárt termőtest kialakulása – mint azt átfogó munkák bizonyítják – számtalan esetben megtörtént a fejlődéstörténet során (Reijnders, 2000; Binder és Hibbett, 2002; Albee-Scott, 2007; Hibbett, 2007; stb.). Így léteznek zárt vagy félig zárt termőtestű fajok szinte valamennyi nagygombacsoport rokonságában, pl. *Boletus* – *Gastroboletus*, *Amanita* – *Torrendia*, *Cortinarius* – *Thaxterogaster*. Több esetben ugyanazon nemzetségen belül is megtalálhatók a szabályos kalapos típusok és az érett állapotban is zárva maradó alakok. Jó példa erre a *Cortinarius* nemzetség, ahol előfordul olyan faj, melynek euagarikoid és gaszteroid alakja egymás mellett létezik, a tranziens formákkal egyetemben (Peintner és mtsai, 2001). Hasonló jelenséget ír le Chiu és mtsai (1989) *Volvariella bombycina* tenyészetben, ahol megjelentek maradó vélummal borított termőtestek is, melyek később sem nyíltak fel. Jellemzően akár egyetlen lókusz mutációja is szekocioid termőtestfejlődéshez vezethet, mint az például a *Panus tigrinus* esetében is bebizonyosodott (Hibbett és mtsai, 1994).

A vizsgálatra kiválasztott gombacsoportok tényleges előfordulási gyakoriságát nehéz megbecsülni. Egy termőtestes faj gyakoriságát gyakran az adott területen gyűjtött termőtestszámmal adják meg, azonban a termőtestek gyakorisága nem feltétlenül arányos a

vegetatív micélium talajnégyzetméterenkénti összstömegével vagy a genetikailag különböző „egyedek” területegységenkénti számával. Földalatti fajok esetén a termőtestek számát még megbecsülni sem lehet kielégítően, sőt, ivartalan szaporodás is előfordul egyes csoportoknál, például éppen a *Tuber* nemzetség egy részénél (Urban és mtsai, 2004). Herbáriumi adatok alapján megbecsülni a gyakoriságot szintén nem célravezető, ugyanis mindig akadnak könnyen megtalálható, vagy preferált fajok, illetve termőterületek, ami eltorzítja a valós képet. Gyakran éppen a ritka fajokról találunk nagyszámú herbáriumi adatot (Babos, 1999). Mára az egyik leginkább megbízható módszer az International Nucleotide Sequence Database (INSDB) nemzetközi molekuláris adatbázisában való keresés, ahol az utóbbi években számos nagyívű, felmérő jellegű munka során született adatot raktározunk el különböző kutatócsoportok (Hibbett és mtsai, 2007). Ezeknek az adatoknak egy része termőtestből származik, amelyek elsősorban filogenetikai vizsgálatokra alkalmasak, másrészt ezek jelentik a referenciát a morfológiai úton nem azonosítható minták meghatározásához. Az utóbbi csoportba tartozó szekvenciákat talajmintákból, mikorrhizált gyökérdarabokból, növényekben élő endofitákból stb. nyerik, egyre növekvő részét adva a szekvenciák összmenyiségének.

A megfelelő DNS régió kiválasztása egy adott feladatra elsősorban a feltárandó taxonómiai csoport függvénye. Azoknak a DNS-szakaszoknak a szekvenciái adnak releváns módon összehasonlítható eredményeket, amelyek különböző taxonokban ugyanazt a funkciót látják el, nagyjából hasonló az evolúciós sebességük és egy kópiában vannak jelen egy genomban, vagy úgy viselkednek. Magasabb kategóriáknál – például rend vagy osztály szinten – konzervatív gének használatosak. Ezek leggyakrabban RNS-kódoló gének (Lutzoni és mtsai, 2004), mint a magban kódolt riboszomális kis és nagy alegység (nucSSU, nucLSU) RNS-einek génjei, a mitokondriális kis alegység (mitSSU) RNS-ének génje, vagy egyes fehérjégének, például RNS polimeráz II domének (RPB1 és RPB2) illetve a transzkripció elvonó faktor 1- α (EF1- α) génjei. Az rDNS-féleségekre jellemző, hogy több példányban vannak jelen a genomban. A nukleáris NOR (nukleólusz organizáló régió) rRNS gének egy vagy több kromoszómán is elhelyezkedhetnek, több száz – több ezer tandem ismétlődő kópiát alkotva (1. ábra). Egy-egy ilyen kópiáról – amely 18S-5,8S-25S sorrendben tartalmazza a géneket – a transzkripció során egyetlen RNS molekula íródik át, amelyből a nem kódoló elválasztó szakaszok (spacer) utólagos érési folyamat során kivágódnak és elemésztnak. A transzkripció egységei között elhelyezkedő, ún. IGS szakaszok (intergenic spacer) nem íródnak át (NTS: non-transcribed spacer); az átíródó elválasztó szakaszokat ITS (internal transcribed spacer) névvel jelöljük.

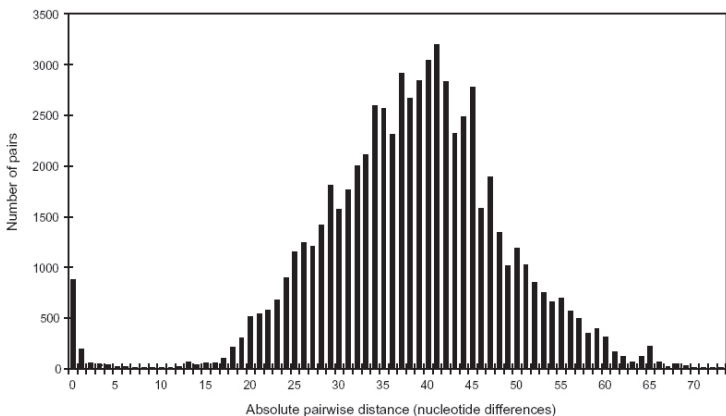


1. ábra A nukleólusz organizáló régió (NOR) sematikus felépítése gombákban.

Az utóbbi években egyre inkább elterjedőben van a többgénés (multilókusz) analízis, melynek során a fent említett gének közül 2-6 szekvenciát kiválasztva azokból egyetlen „szuperszekvenciát” (multilocus dataset) készítenek, amely több ezer nukleotid hosszúságú lehet, amivel a taxonok közötti különbséget jelentő filogenetikailag informatív karakterek (tehát nukleotidok) száma jócskán megnövelhető. Multigénés szekvenciákon alapuló kiemelkedő munkák például Tanabe és mtsai (2004) dolgozata a járomspórás gombák (Zygomycota) területén (RPB1 és EF1- α), Binder és Hibbett (2002) négy génre (nucSSU, nucLSU, mitSSU, mitLSU) alapozott taxonómiai alapműve a Homobasidiomycetes osztályról, Hofstetter és mtsai (2007) fehérje- és riboszomális gének (RPB1, RPB2, nucSSU, nucLSU, mitSSU) használhatóságát összevető cikke a zuzmóképző gombákról, vagy James és mtsai (2006) alapkőnek számító, 6 gént vizsgáló (nucLSU, nucSSU, 5,8S rRNS, RPB1, RPB2, EF1- α) publikációja. Fehérjégének esetében az informatív karakterek száma meghaladhatja az RNS génekéit (Frøslev és mtsai, 2007), főleg a tripletek harmadik nukleotidjaiból adódó változékonyság okán, azonban nemzetségen belüli összehasonlításra gyakran így is alkalmatlanok. Utóbbi célra az említett ITS az általánosan használt és elterjedt régió, mely a nucSSU és nucLSU között helyezkedik el, és magába foglalja az 5,8S rRNS génjét. Teljes hossza igen változó, gombáknál általában az 500-900 bp mérettartományba esik, ebből az 5,8S rRNS génje mintegy 167 bp. Mivel a transzkriptumból kivágódó, nemkódoló szakasról van szó, mutációs rátája jóval magasabb a konzervatív génekénél, éppen ezért fajok közötti összehasonlításra azoknál hatékonyabban alkalmazható. Előfordulnak azonban olyan esetek is, ahol önmagában az ITS szakasz elemzése nem hozza meg a várt eredményt. Ha túl alacsony a variabilitás, megtörténhet, hogy morfológiaiilag

különbözőnek határozott fajok csaknem vagy teljesen azonos ITS régiót mutatnak. Ennél gyakoribb az az eset, hogy egy egységesnek tartott faj példányai genetikailag eltérnek, tehát kriptikus fajokról van szó, amint azt például Kytövuori és mtsai (2005) kimutatták *Cortinarius* minták feldolgozásakor.

Adott nemzetségen belül a fajokba és az az alatti kategóriákba sorolás problémája igen régóta foglalkoztatja a kutatókat. Két minta ITS szekvenciájának összevetése során az illeszkedő nukleotidok összességét megadhatjuk abszolút számmal vagy százalékos arányban. Az eltérő nemzetségekben a fajon belüli genetikai variabilitás foka ugyan különböző lehet, azonban értelemszerűen mindig kisebb, mint az adott nemzetség eltérő fajai közt adódó érték. Ezeket grafikusan, diszkrét eloszlásfüggvényen is ábrázolhatjuk (2. ábra), amennyiben kategóriatengelyen jelöljük az összehasonlított taxonok közt páronként számított összes előforduló távolságértéket, hozzájuk rendelve az azoknak megfelelő páronkénti összehasonlítások számát (előfordulási gyakoriságát). Amennyiben genetikailag szeparálódott fajokról van szó, a grafikonon egy ún. *barcoding gap* (egyfajta faji elválást jelző rés) figyelhető meg, mely az egyes nemzetségekben jellemzően eltérő intervallumot ölelhet fel.



2. ábra *Cortinarius* nemzetség fajainak ITS alapú, páronkénti illesztésen alapuló összehasonlító analízise (*pairwise analysis*). Jól megfigyelhető egy hiátus (*barcoding gap*) a fajokon belül (0-5 nt) és a fajok között számított (>12 nt) szekvencia-eltérési tartományok közt, ami alkalmas a faji elválás mértékének ITS alapú jelzésére. (Frøslev és mtsai (2007) munkájából átvéve)

A következőkben három kiválasztott gombacsoportról adunk rendszertani áttekintést. Az első a rendkívül gyakori *Tuber* nemzetség egy jellegzetes és problémás csoportja. Elterjedtségét, az ökológiában betöltött nélkülözhetetlen szerepét bizonyítja az INSD-ben tárolt több száz, mikorrhizált gyökérvégéből származó ITS szekvencia, mely szám a másik csoportként kiválasztott *Melanogaster*-ek esetében mindössze 6 különböző adat. A harmadik csoportot alkotó *Hygrocybe* fajokat (mikorrhiza hiányában) a talajmintából izolált tenyészetekből nyert ITS szekvenciák számával jellemezhetjük, jelenleg mintegy 30 ilyen adat (hivatkozás) áll rendelkezésünkre az adatbázisban.

A „kis fehér *Tuber*” fajok rendszerezésének problémái

Az ektomikorrhizas *Tuber* nemzetség számos faja rendelkezik komoly gazdasági és ökológiai jelentőséggel. Magas gasztronómiai értéke folytán a „valódi” szarvasgombák néhány fájának termőteste világszerte keresett termék. Élőhely-preferencián alapuló megkülönböztetésükről már magyar kutatók tollából is születtek fontos eredmények (Bratek és mtsai, 1992; Bratek és mtsai, 2001). A több kontinensen élő, úgynevezett *Puberulum* „A” csoport (Knapp, 1950) azokat a taxonokat foglalja magába, melyeknek perídiuma világos tónusú, spóráik pedig hálózatos díszítettségűek. A csoport egyes fajainak megkülönböztetése gyakran komoly nehézségekbe ütközik, még a perídium és a spórák tulajdonságainak részletekbe menő vizsgálatával is. Ennek a kutatásnak az volt a célja, hogy feltárja az európai – ezen belül is főként a Kárpát-medencei – fajok morfológiai bélyegekre, illetve az ITS szekvenciákon alapuló filogenetikai adatokra épülő rokonsági szálait. Különös figyelmet kapott a *Tuber rapaeodorum* Tul. & C. Tul., vagyis a mustárszagú szarvasgomba, az a faj, amely talán a legtöbb vitát váltotta ki a gombataxonómusok közt. Jelen vizsgálatok több lábon álló, megalapozott eredményeket biztosítanak a *Tuber* fajok későbbi monográfiáinak megszerkesztéséhez is.

A *Tuber rapaeodorum*-ot közeli rokonságba tartozónak vélik a *Tuber maculatum* Vittad., *Tuber borchii* Vittad., valamint *Tuber puberulum* Berk. & Br. fajokkal. A *Puberulum* „A” csoport több földrészen előfordul. Gross (1987) valamint Ceruti és mtsai (2003) szerint a *Tuber rapaeodorum* széles körben elterjedtnek tekinthető. A *Tuber borchii*, *T. maculatum* és *T. puberulum* fajokat is számos országból jelezték (Alvarez és mtsai, 1993; Zhuang, 1998; Montecchi és Sarasini, 2000; Trappe és Cázares, 2000; Rioussel és mtsai, 2001; Ceruti és mtsai, 2003).

A csoport fajainak elkülönítésére alkotott elméletek idővel kaotikus állapothoz vezettek, ugyanis csak kevés szerző vizsgálta meg a holotípusokat. Több szerző szerint a *T. puberulum* és a *T. borchii* a legközelebbi rokonok a csoportban, de Mello, Garnero és Bonfante (2000) morfológiai bizonyítékokat hozott fel a *T. borchii* és *T. maculatum* szoros rokonsági kötelekeinek alátámasztására is. Hollós (1911) a *T. borchii* és *T. rapaeodorum* elkülönítésére a következő tulajdonságokat tekintette alapvetőnek: gömbölyded illetve ellipszoid spórák, a termőtest mérete, a peridium színe és szerkezete, valamint a gleba színe és illata.

Pegler, Spooner és Young (1993) a *T. rapaeodorum*-ot önálló fajként tárgyalja, melynek keskenyebb spórái (hossz/szélesség arány: 1,45-1,75) jól elkülönítik a *T. borchii*-től, ahol ez az arány mindössze 1,2-1,4. Más szerzőknél is szerepel elkülönítő bélyegként a *T. rapaeodorum* feltűnően megnyúlt spóráinak ellipszoid alakja. 4-spórás aszkuszt alapul véve a spóraméretetek a következők: 32-42 x 23-29 µm (Tulasne és Tulasne, 1862), 30-33 x 22-26 µm (Knapp, 1950), 26 x 21 µm (Lange, 1956). Több munkában említik az aszkuszonkénti jellemző spóraszámot, mint konzervatív bélyeget (Hawker, 1954; Montecchi és Lazzari, 1987). Így a *T. borchii* aszkuszai között nagyobb arányban van jelen az 1-2 spórás, a *T. rapaeodorum*-nál pedig a 3-4 spórás. A spórák térfogata is szolgálhat fajra jellemző bélyegként (Gross, 1987). Továbbá, a *T. rapaeodorum* peridiuma 150-220 µm vastag (Pegler és mtsai, 1993), Knapp (1951) szerint 300 µm-nél vékonyabb, míg a *T. borchii*-é 250-400 µm (Pegler és mtsai, 1993) vagy 300-500 µm (Lange, 1956) vastag. A friss *T. rapaeodorum* termőtest peridiumának külső rétegét egy 100-150 µm vastag pszeudoparenchimatikus réteg alkotja, mely enyhén szögletes, 15-20 x 9-15 µm nagyságú elemekből áll, a belső zóna ennél keskenyebb, és egymásba fonódó hifák alkotják (Pegler és mtsai, 1993). A *T. borchii* pszeudoparenchimatikus peridiuma enyhén szögletes, izodiametrikus sejtekből áll, melyek legnagyobb átmérője 10-28 µm, szélessége 8-22 µm. Gross (1987) szerint mindkét faj dermatocisztidái ritkások, elkeskenyedők, hegyesek és vastag falúak. Ezek mérete a *T. rapaeodorum* esetében 56-80 x 3-5 µm, a *T. borchii*-nál pedig 50-80 x 4-5 µm. Mello, Garnero és Bonfante (2000) hasonló dermatocisztidákat talált a *T. borchii* neotípusán. Ceruti, Fontana és Nosenzo (2003) is megfigyelte őket mindkét fajnál, de csak fiatal termőtesteken.

Fischer (1897) a *T. rapaeodorum*-ot a *T. puberulum* szinonimjának tartotta, és ezt átvette tőle Montecchi és Lazzari (1993), Montecchi és Sarasini (2000) valamint Rioussset és mtsai is (2001). Hollós (1911) egyetértett ugyan a szinonimizálással, de a *T. rapaeodorum* nevet tartotta meg a *T. puberulum*-mal szemben. Megint mások morfológiai jegyek alapján, mint pl. a *T. puberulum* gömbölyded spórái és robosztusabb, nagyszámú dermatocisztidái

szétválasztják a két taxont. A vizsgált fajcsoportban a *T. puberulum* esetében találjuk a legtöbb 1-spórás aszkuszt (Szemere, 1965; Pegler és mtsai, 1993). A *T. puberulum* perídiumvastagsága eléggé eltér a különböző szerzőknél, 100 µm Knapp-nál (1951) és 100-200 µm Lange munkájában (1956), ám minden esetben megegyeznek abban, hogy pszeudoparenchimatikus rétegről van szó, melyet kisméretű, gömbölyded vagy enyhén szögletes, 10-15 µm átmérőjű sejtek alkotnak. Az 1-4 szeptummal rendelkező dermatocisztidák 60-110 µm hosszúak, az alapjuknál 4,5-9 µm szélesek, elkeskenyedők és a csúcsukon hegyesek.

Bucholtz (1901) új „kis fehér” *Tuber* taxont írt le, melynek a *Tuber puberulum* var. *michailowskjanum* nevet adta, és későbbi művében (Bucholtz, 1907), már faji rangra emelve azt *T. michailowskjanum* néven szerepeltette. Az izotípus, későbbi vizsgálata során *T. rapaeodorum*-nak bizonyult (Halász és mtsai 2005), mint azt korábban Gross (1987) valamint Ceruti és mtsai (2003) is valószínűsítette. Az ellentmondásos fajleírások és közlemények részben azzal magyarázhatók, hogy a szerzők egy része nem tanulmányozta a típusanyagokat. Mello és mtsai (2000) neotípusokat jelölt ki a *T. borchii* és *T. maculatum* esetében, és prezentálta a típusok leírását. A teljes képhez ugyanakkor hozzátartozik, hogy a típusanyagok gyakran egy évszázadnál is öregebbek és meglehetősen rossz állapotban vannak, sőt, az is előfordul, hogy juvenilis termőtestet jelöltek ki típusanyagnak. Az eredeti leírások is általában túl rövidek és hiányosak. A fajon belüli természetes változékonyság gyakran képes elfedni a különbségeket ezek között a meglehetősen hasonló fajok között. Annak érdekében, hogy a dolgozatban szereplő fajkonceptciók ne kerüljenek ellentmondásba az eredeti fajleírásokkal, a típusanyagok részletes vizsgálatára volt szükség, aminek eredményét James M. Trappe jóvoltából használhattuk. Ugyanezek a részletes mikroszkópos vizsgálatok lettek elvégezve azokon a mintákon, amelyekből a molekuláris biológiai vizsgálatokat megvalósítottuk.

A hazai *Melanogaster* anyagok és a fajok rendszerezésének problémái

A Kárpát-medence területéről először Hollós László (1911) jelezte a kocsonyáspöfeteg fajokat (*M. ambiguus* és *M. variegatus*). A világhírű magyar mikológus az Alföld leggyakoribb földalatti gombájának nevezte a *M. variegatus*-t, melyet „vörös szarvasgomba”-ként említett és a termesztését is javasolja, mint ízletes csemegegombáét. Csak a félreértések elkerülése érdekében érdemes megjegyezni, hogy a Hollós gyűjtéséből fennmaradt Kárpát-medencei *M. variegatus* herbáriumi anyagok ma kivétel nélkül *M. broomeianus* néven vannak számon tartva. Sajnos Hollós László Kecskeméten tárolt herbáriuma 1912-ben elégett, de

néhány eredeti Hollós-féle gyűjtés még ma is fellelhető a budapesti, illetve a pozsonyi növénytár herbáriumában és egyéb külföldi gyűjteményekben. Az 1950-es évektől kezdve Szemere László gyarapította a hazai leletanyagot *Melanogaster* gyűjtésekkel (Szemere, 1970), számos exszikkátum azonban sokáig *Rhizopogon* néven szerepelt a Magyar Természettudományi Múzeum Növénytárában (Bratek és Halász, 2005). Később, az 1970-es évek közepétől az 1990-es évek elejéig csak mintegy tucatra tehető a herbáriumban is deponált hazai gyűjtések száma, viszont Erdélyben újra megindult a földalatti gombák tudományos célú gyűjtése, Pap Géza, Misky Mihály és Pázmány Dénes munkájának köszönhetően. (Pázmány, 1991). Az igazi áttörést és a herbarizált anyagok számának ugrásszerű megnövekedését a '90-es évek hozták, amikor elindult a földalatti gombafajok szervezett feltérképezése Magyarországon, majd később a Kárpát-medence határainkon kívülre eső területein is. Csak *Melanogaster*-ből több mint 240 herbáriumi adat gyűlt össze a mai napig, kiteljesítve a Hollós által elkezdett kutatómunkát (Merényi és mtsai, 2008).

A nemzetség taxonómiai pozíciója sokat változott az elmúlt évtizedek folyamán. Mint a gaszteroid termőtestet fejlesztő gombák többségét, sokáig a kocsonyáspöftegeket is csak néhány jellegzetes makro- és mikromorfológiai bélyeg alapján tudták jellemezni, hiszen a kalaposgombák esetében megszokott, termőrétegen és tönkön megfigyelhető-mérhető tulajdonságok hiányoznak, vagy jelentősen redukálódtak. Lohwag (1926) még korallóid fejlődésmenetűnek gondolta a termőtestfejlődést, Fischer (1933) már lakunárisnak tartja. Pegler és mtsai (1993) még a tintagomba (*Coprinus*) nemzetséggel tartotta rokonnak a *Melanogaster*-eket, a sötétbarna, sima spórák, valamint a tintaszerű, elfolyósodó gleba okán.

Besl és mtsai már 1996-ban kimutatta a *Paxillus*-hoz fűződő közeli rokonságot a chamonixin és involutin pigmentek jelenléte révén, sőt, RFLP módszerrel is bizonyította ezt. A kétséget kizáró bizonyítékot a riboszomális régió nukleotidszekvenciájának meghatározása jelentette (Bruns és mtsai, 1998; Binder és Bresinsky, 2002). A zárt termőtestű *Melanogaster* nemzetség a jelenlegi felfogás szerint a Boletales rendbe, a Paxillaceae családba tartozik. Ugyanebbe a családba sorolják még a honos nemzetségek közül a *Paxillus*, *Sarcopaxillus*, *Gyrodon* és *Alpova* génuszokat, tehát kalapos és zárt termőtestű is akad köztük.

A *Melanogaster* genus-t 1831-ben Corda hozta létre, típusfajként a *M. tuberiformis*-t jelölve meg. A nemzetség mintegy 10-12 fajt foglal magába, a szinonimák száma eléri az ötvenet is. Fajai Euráziában és Észak-Amerikában elterjedtek, innen napjainkban is írnak le újabb fajokat (Wang és mtsai, 2005). A nemzetség mikorrhizaképző, a *M. ambiguus* mikorrhizáját már leírták, sőt, mikorrhizálási kísérleteket is végeznek a fajokkal (Parladé és mtsai, 1996). A gazdanövények között megtalálhatunk mérsékelt övi lombhullató és örökzöld

fafajokat, mint *Quercus*, *Corylus*, *Cedrus*, *Pinus*, *Tilia*, *Populus*, *Betula*, sőt, *Cistus* (Comandini és mtsai, 2006).

Termőtestük általában 1-10 cm átmérőjű, gömbölyded vagy szabálytalan, burgonyagumó alakú, jellegzetes illata gyümölcsre, rumra vagy hagymára emlékeztet. A 0,5-1 mm vastag perídium vörösbarna, sárgásbarna, filces felületű, gyakran repedések futnak rajta. A perídium felületéhez hasonló színű, vastag micéliumstrángok tapadnak. A gleba kamrás szerkezetű, fiatalon sárgásbarna színű. Az érett spóratömeg az autolizáló steril hifákkal és bazídiumokkal együtt fekete, tintaszerű gél, majd folyadékot képez, mely kitölti a fehéres-sárgás falú kamrácskákat.

A felsorolt makroszkopikus karakterek alkalmatlanok a nemzetségen belüli taxonok megkülönböztetésére, hiszen a termőtest színe, mérete, a perídium és a gleba szabad szemmel is látható tulajdonságai igen hasonlóak. A hangsúly a mikrobélyegek felé tolódik el: a legfontosabbak és leginkább használhatóak a spórák ornamentikája, alakja és mérete. Az újabb publikációk alapján (Pegler és mtsai, 1993; Montecchi és Sarasini, 2000) a perídium szerkezete mellőzött a határozásnál. A bazídiumonkénti spóraszám is fontos és hasznos határozóbélyeg lehet, a legtöbb fajnak 4-spóras, de néhánynak 8-spóras bazídiuma van (Tulasne és Tulasne, 1843). Sajnos exszikkátumokból nagyon nehezen restaurálhatóak a bazídiumok, így ez a karakter csak korlátozottan használható.

Számos munkában a fajhatárok megvonása spóramorfológia alapján folyik, hiszen az egyes provizórikus fajokat egymástól többé-kevésbé élesen elkülöníthető bazidiospóra méretek és alakok jellemzik. A Kárpát-medencei gyűjtések mindegyike sima spóras, de többféle spóraalakot, és -méretet találunk. Ezekre alapozva a Kárpát-medencében előkerült fajok száma 4-7 között van, a szerzők eltérő fajkonceptiójától függően. Morfológiai határozást alapul véve a következő taxonok kerültek elő:

Melanogaster ambiguus (Vittad.) Tul. & C. Tul.

Melanogaster broomeianus Berk.

Melanogaster intermedius (Berk.) Zeller & C.W. Dodge

Melanogaster macrosporus Velen.

Melanogaster tuberiformis Corda

Melanogaster variegatus (Vittad.) Tul. & C. Tul.

Melanogaster vittadinii Soehner et Knapp.

A *M. ambiguus* fajt Vittadini (1831) említi először *Octaviana ambigua* néven, és ábrát is közöl a termőtestről és a spóráról, ez utóbbihoz méretet azonban nem ad meg. A

Tulasne testvérek 1843-ban sorolták át a fajt a *Melanogaster* nemzetségbe, a *M. variegatus*-szal egyetemben. A spóraméretre utalást sem ők, sem Berkeley és Broome (1844) nem adtak, de a fő jellegzetességet, a papillázottságot mindannyian kiemelik. Hollós (1911) megfogalmazása szerint „Spórái visszás tojásídomúak, simák, csúcsukon tompa szemölcsessel, néha lekerekítettek, aljukon rövid, szintelen nyélmaradvánnyal, eleinte szintelenek, aztán barnászörösek, többnyire egy nagy cseppel, végre sötétbarnák, átlátszatlanok, 8-10 x 12-16 μ méretűek.” Mattiolo (1935) 13-18 x 8 μ m-t ad meg spóranagyságra. Knapp (1954) a spóraméretet (13)-15-17 x 7,5-9,5-(10) μ m közé teszi, megjegyezve, hogy előfordulnak ennél jóval nagyobb, úgynevezett óriásspórák is. Ugyanő kitér arra is, hogy akadnak gyűjtések, melyeknél a papilla többnyire hiányzik, ez azonban nem tekinthető önálló faji bélyegnek; ezeket az anyagokat *M. ambiguus* f. *clavisporus* Pilát néven különíti el. Svrček (1958) hasonló mérethatárokat ad meg: 12-17 x 7,5-10 μ m. Lange (1956) szerint a papilla megléte nem annyira stabil tulajdonság, hogy ez faji bélyegnek számíthatna, így inkább a termőtest kis mérete és olajbarna színe a meghatározó. Szemere (1965) a tágabb mérethatárt 9-24 x 6-14 μ m közé teszi, és megemlíti a papillát is, bár szerinte ez elvértve fordul elő.

A *M. intermedius* eredeti leírása 1844-ben született, *M. ambiguus* var. *intermedius* néven (Berkeley és Broome, 1844). A leírás szerint a *M. ambiguus*-énál jóval kisebb spóraméret, ám változatosabb spóráalak jellemzi. Zeller és Dodge (1936) fajszintre emeli, a spórák alakját a *M. ambiguus*-étől eltérően többnyire tojásdadként jellemzi, esetenként kissé kihegyesedő csúccsal, és a spóraméretet is megadja: 11-13 x 7,4-8 μ m. Knapp (1954) bírálja ezt a fajleírást, kiemelve, hogy a *M. ambiguus* és *M. intermedius* megadott spórajellemzői átfednek, és a Zeller és Dodge által közölt táblán szereplő spórarajzok nem fedik teljesen a szöveges részben leírtakat. A Knapp szerinti *M. intermedius* átlagos spóraméret 12-14 x 8-9 μ m, szemben a *M. ambiguus* 15-17 x 7,5-9,5 μ m-ével. Lange (1956) a *M. macrosporus* szinonimjaként fogja fel a *M. intermedius*-t. Szerinte az átlagos spóraméret 14,8-17,2 x 8,6-9,5 μ m, ami szinte tökéletesen átfed az általa megadott *M. ambiguus*-éval (átl. 15,4-17,6 x 8,9-9 μ m). A megkülönböztető karakterek mindössze makroszkopikus jegyek lennének, mint a perídium színe, vastagsága vagy a termőtest mérete és szaga.

A *M. tuberiformis* Corda-féle típusanyaga Zeller és Dodge (1936) vizsgálata szerint viszonylag kicsi, 10-11 x 5,5-7 μ m spórákkal rendelkezik. A Tulasne testvérek (1843) a dimenziókat 9,6-11,2 x 6,4 μ m-ben adják meg. A *M. tuberiformis*-t Knapp (1954) nagyon ritka fajként tárgyalja, és spóraméret alapján könnyen elkülöníthetőnek tartja a szintén mindig papilla nélküli *M. macrosporus*-tól. A normál érett spórák szerinte 13-15 x 7,5-9 μ m nagyok, tehát valamivel keskenyebbek a 13-18 x 6,5-7,5-(8) μ m-es *M. macrosporus* spóráktól.

Hozzáteszi azonban, hogy a spórák nagysága igen változatos, a kisebbek 10-12 x 7-8 µm méretűek. A *M. macrosporus*-t Velenovsky írta le 1922-ben, azonban hiányzik néhány adat, mint a spóra szélessége is. Lange (1956) szintén ritkának tartja a *M. tuberiformis*-t, 10,5-14,4 x 5,8-6,8 µm-es spórákkal (átl. 11,9-12,0 x 6,3-6,4 µm). Svrček (1958) átveszi Knapp adatait, így hasonló méreteket ad meg a *M. tuberiformis* és *M. macrosporus* esetében is. Montecchi és Lazzari (1993) saját példányai alapján 10-15 x 5,2-8 µm-t ad meg *M. tuberiformis*-ra és 12,5-16,5 x 6-7,5 µm-t *M. macrosporus*-ra, tehát utóbbit megnyúltabbnak tartja.

A *M. variegatus*-t Vittadini (1831) *Octaviania variegata* néven vezeti be és színes táblán mutat be egy érett termőtestet, spórarajz nélkül. Hollós (1911) másik említett *Melanogaster* faja a *M. variegatus*, melyet az Alföld leggyakoribb földalatti gombájának nevez. A spóraméretet 6-10 x 4-6 µm-ben állapítja meg. Mattiolo (1935) ennek az alsó határát jelzi, 6,8 x 4 µm szerinte a jellemző adat. Knapp (1954) két anyag spóráinak rajzát és méretét közli a Tulasne-féle herbáriumból. Eszerint a spóraméret 6-8 x 3-5 µm között van. Lange (1956) szerint a *sensu stricto* *M. variegatus* spóraszélességével rendelkező gombák csak Dél- és Közép-Európában élnek, így minden skandináviai leletet *M. broomeianus* néven tart nyilván. Svrček (1958) 6-8-(10) x 3,5-5,5 µm közé helyezi a spóraméretet. Szemere (1965) ennél a fajnál is igen tág intervallumot ad meg (4-13 x 2-6 µm). Montecchi és Lazzari (1993) szerint a spórák nagysága 6-8 x 4-5,5 µm között van.

A *M. broomeianus*-t Tulasne különítette el a *M. variegatus*-tól, keskenyebb, hengeres spórája révén. A szétválasztás egyébként nehézkes, mivel más, megbízható karakter nem ismert. A problémás elkülönítést már Tulasne-ék is megemlítik (1843). Berkeley és Broome (1844) szintén hosszabb magyarázatot fűz a két fajhoz, megjegyezve, hogy még nem látott olyan ragyogó sárga peridiumú *M. broomeianus*-t, mint ami a *M. variegatus*-ra jellemző. Azt is hozzáteszi, hogy a *M. broomeianus* sápadtabb színe és gyengébb illata valószínűleg az eltérő éghajlatnak köszönhető, mint azt egyébként Tulasne és Tulasne is állítja (1843). Ugyanők a *Fungi Hypogaei*-ben (1851) már változatként közlik *M. variegatus* var. *broomeanus* (Berk.) Tul. & C. Tul. néven. Hollós (1911) figyelmen kívül hagyja a hengeres spórák okozta nehézségeket, és minden kérdéses anyagot *M. variegatus*-ként határoz meg, pedig még a fennmaradt eredeti gyűjtései közül is több tipikusan *M. broomeianus* spórákkal rendelkezik. Knapp (1954) a *M. broomeianus* – *M. variegatus* ellentmondást kiegészíti azzal, hogy az előbbi faj hengeres és csapott bázisú spórái emlékeztetnek a *M. rubescens*-éire, és a rendelkezésre álló anyagok egy része inkább azzal lenne rokon. Lange (1956) javaslata az, hogy az Észak-Európában gyakori, keskeny spórás gombákra legyen érvényes a *M. broomeianus* név, a ritka, széles spórások pedig továbbra is *M. variegatus* alatt szerepeljenek.

Az általa közölt határozókulcs szerint a *M. broomeianus* spórája 7-9 x 4 µm, a *M. variegatus*-é pedig 7,5-10 x 5,5-8 µm. A kettő közötti mérettartományról egyszerűen nem vesz tudomást. Svrček (1958) 6-9 x 3-4 µm-es hengeres spórákkal jellemzi a fajt, de megkülönböztet egy *M. broomeianus* var. *pseudorubescens* változatot is nagyobb, (7,5)-8-10-(11) x 4-5-(5,5) µm-es spórákkal. Montecchi és Lazzari (1993) a hosszúság/szélesség hányadosát is megadja, *M. broomeianus*: kb. 2,0 és *M. variegatus*: 1,3-1,6.

A *M. vittadini* egy Vittadini által gyűjtött kevert anyag széles spórájú alakjáról lett leírva. Knapp (1954) ezt a termőtestet 7,5-11 x 5,5-7,5-(8) µm-es spórákkal jellemzi, de megemlíti, hogy saját gyűjtésű (bár bevallása szerint éretlen) termőtestei 6-9-(10) x 5-6 µm nagyságú spórákkal rendelkeznek. Lange (1956) Knapp-pal összhangban állítja, hogy Vittadini eredeti *M. variegatus* típusanyaga keverten tartalmaz nagyon széles (7,5-10 x 5,5-8 µm) és keskeny (7,2-9 x 3,8-4,1 µm) spórájú termőtestet. Azonban nem ért egyet vele abban, hogy a széles spórájú formát külön fajként kellene kezelni, ő ezt nevezi *M. variegatus*-nak.

Az *Alpova* nemzetség (Dodge, 1931) néhány faja közeli rokonságban áll a *Melanogaster*-ekkel. Így például az *A. rubescens* eredetileg *Octaviania rubescens* néven került leírásra (Vittadini, 1831), majd sokáig a *Melanogaster*-ek között kapott helyet (Tulasne és Tulasne, 1851). Mattiolo (1935) munkájában a *M. rubescens*-t felsorolja, megjegyezve, hogy a 9-10 x 5-6 µm méretű megnyúlt spórák hialinok. Trappe (1975) nagyszámú új adat alapján revideálta az *Alpova* nemzetséget, és néhány fajt átsorolt a *Melanogaster* nemzetségből. Így ott kapott helyet a *microsporus* és a *rubescens*, többek között halványabb spórájuk és vékonyabb perídiumuk (<0,5 µm) miatt.

Szemere (1965) megemlíti a *Melanogaster odoratissimus*-t, mint honos fajt, ám vizsgálataink szerint ez a lelet (leg.: László K., 1961. V. 28. Brassó: Nagy-Függőkő) *Hymenogaster aromaticus*-nak bizonyult. A felsorolt fajok közül mindössze négyet ismer el a szerzők többsége (*M. ambiguus*, *M. broomeianus*, *M. tuberiformis* és *M. variegatus*), és ezek közül is a *M. broomeianus*-t sokan azonosnak tartják a *M. variegatus*-szal.

A *Hygrocybe* nemzetség jellemzése, rendszerezési problémái

A *Hygrocybe* elnevezés a svéd Elias Fries-től, 1821-ből származik, aki a csoportot a *Clitocybe* nemzetségbe sorolta, eleinte *Hygrocybe* subtribus néven, ahol csak 1838-ban emelkedett tribus szintre. Önálló nemzetség rangjára Kummer emelte 1871-ben. A *Hygrocybe* genus a mikológusok jelentős része szerint (Boertmann, 1995; Krieglsteiner, 2001) a *Hygrophorus* nemzetséggel együtt jelenleg a *Hygrophoraceae* családba tartozik. A *Hygrocybe*

nemzetséget a legtöbb kutató három alnemzetségre bontja, úgymint: subgenus *Hygrocybe* s. str. Bon 1976, subgenus *Pseudohygrocybe* Bon 1976, és subgenus *Cuphophyllus* Donk 1962 (Boertmann, 1995; Candusso, 1997; Krieglsteiner, 2001).

A *Hygrocybe* nemzetségre jellemző legfontosabb makroszkópikus ismertetőjegyek: ritkánálló, vastag és „viaszszerű” lemezek, fehér színű spórapor, vélum nélküli tönk. A legjellemzőbb közös mikroszkópikus *Hygrocybe* ismertetőjegyek: hosszú és keskeny bazídiumok (6–9–szer hosszabbak szélességüknél), sima és inamiloid spórák, valamint az, hogy az európai taxonoknál hiányoznak a valódi cisztidák. A három alnemzetség biztos megkülönböztetésénél a lemeztráma hifák elrendeződése, struktúrája a legmegbízhatóbb határozóbélyeg (Boertmann, 1995).

A *Hygrocybe* alnemzetség fajainak lemeztráma hifái szokatlanul hosszúak (hosszuk meghaladja az 1mm-t) és egymásra merőlegesen, vagyis reguláris struktúrájúak, mint pl. a *Hygrocybe conica* faj esetében.

A *Pseudohygrocybe* alnemzetség fajainál a lemeztráma hifák rövidek (ritkán hosszabbak 150 µm-nél) és egymásra nem merőlegesen, vagyis szubreguláris elrendeződésűek. Ebben az alnemzetségben ettől csak a *H. ovina* tér el, amelynél a lemeztráma hifák hossza meghaladhatja a fél millimétert is. Ebbe az alnemzetségbe tartoznak a Herink által 1959-ben elkülönített *Neohygrocybe* és *Gliophorus* nemzetségek is, amelyeknek a fajai muszkaflavin pigmentet nem tartalmaznak.

A *Cuphophyllus* (*Camarophyllus*) alnemzetség fajainak lemeztráma hifái szintén rövidek, hosszuk egyik taxon esetében sem haladja meg a 150 µm-t, henger alakúak és teljesen szabálytalan, kusza szövedéket alkotnak (irreguláris lemeztráma).

Bas (1990) a *Hygrocybe* nemzetséget a *Camarophyllopsis* nemzetséggel együtt, mint tribus Hygrocybeae a Tricholomataceae családba sorolja. Szerinte tehát a *Hygrophorus* s. str. alnemzetség is, mint önálló tribus, szintén a pereszkék családjába lenne sorolandó. Candusso 1997-ben a *Hygrocybe* nemzetséget az Agaricaceae családba sorolja, a *Camarophyllopsis* nemzetség nélkül. Bon (1992) a Hygrophoraceae családodot taxonómiailag annyira izolálnak tartja, hogy javasolja az Agaricales rendről leválasztani, és mint külön Hygrophorales rendet föltüntetni.

Ma – szerzőtől és rendszertani felfogástól függően – 60 és 133 között mozog az európai nedűgomba taxonok száma, de a trópusi területekről egyre újabb és újabb fajokat írnak le jelenleg is (Cantrell és Lodge, 2000; Laessle és Boertmann, 2008). Míg pl. Moser, Courtecuisse és Bon egyes taxonokat magasabb taxonómiai szintre emel (faji rangot ad változatoknak és formáknak is), addig Boertmann esetenként több, addig különálló fajt

összevonva erőteljesen lecsökkenti a nedűgomba taxonok számát. Ez a két ellentétes folyamat jelenleg is zajlik; hiszen míg pl. Bon gyakran teljesen új nedűgomba fajokat publikál, addig Boertmann nemcsak fajokat von össze, hanem összevonta a nedűgomba (*Hygrocybe*) és a nyirokgomba (*Camarophyllus*) nemzetségeket is, és sorban szünteti meg a nedűgomba nemzetségén belüli alnemzetségek egyes szekcióit.

Ugyanakkor viszont az is igaz, hogy tőle is jelennek meg publikációk új *Hygrocybe* taxonokról, ám ezek ritkán jönnek létre kettő régebbi taxon összevonása nélkül. Kivételek is vannak, pl. a *H. laeta* var. *flava* Boertm. var. nov., vagy ami a *Hygrocybe lacmus* alakkörét illeti, ahol Boertmann három jól elkülöníthető fajt különböztet meg (*H. lacmus*, *H. flavipes*, *H. radiata*). Ezeket Krieglsteiner összevonja, és *H. lacmus*-ként tárgyalja (Krieglsteiner, 2000).

Fontos kemotaxonómiai határozóbélyeg lehet a már említett muszkaflavin pigmentek jelenléte. Bresinsky és Kronawitter (1986) 53 *Hygrocybe* fajt megvizsgálva 42-ben mutatott ki muszkaflavinokat, míg 11 faj nem tartalmazza ezeket. A szerzőpáros a pigmenttartalom alapján 6 csoportot állít fel, melyek közül 3 öleli fel ezt a 11 fajt. A biokémiai jellemzők (főként speciális anyagcsereutak) alapján történő csoportosítás a jelenkori rendszerezés igen fontos alappillére és gyakran alkalmazzák különböző gombataxonok esetében is (pl. Agerer, 1999; Binder és Besl, 1999). A *Hygrocybe* nemzetség korábbi egyetlen, számunkra ismert átfogó molekuláris biológiai vizsgálatát Beisenherz (2002) végezte rDNS RFLP analízis és citofluorometriai módszer segítségével.

Boertmann rendszer- és nevezéktana szerint Magyarország területéről eddig összesen 35 taxont ismerünk (Zagyva, 2001; Zagyva, 2003). A *Hygrocybe* nemzetség szempontjából magyarországi viszonylatban az Őrségi Nemzeti Park területe az egyik legjobban kutatott és feltárt térség; innen 34 taxonról van tudomásunk, ahonnan egyedül a bazofil *H. conicoides* nem került elő napjainkig.

Kutatásunk az ismert élőhelyek számához képest rendkívüli faji sokféleséget mutató magyarországi nedűgomba-állományra épült. A *Hygrocybe* s. l. nemzetség részletes rendszertani viszonyait – igen vitatott, és gyakran a csoport egységes jellegét is megkérdőjelező taxonómiai elhelyezkedésük miatt – a könnyebb áttekintés érdekében saját eredményeink tükrében, a Diskusszióban fejtjük ki.

Célkitűzés

Munkánk során a különböző élőhelyek gombapopulációinak felderítése és molekuláris taxonómiai azonosítása volt a célunk, abban a reményben, hogy eredményeinkkel elősegíthetjük megfelelően mikorrhizált, ökológiailag stabil telepített erdők kialakítását és a mezőgazdaságilag más módon nem hasznosítható területek természetes környezetbe történő beillesztését, továbbá hozzájárulunk egyes veszélyeztetett és törékeny egyensúlyú életközösségek mikótájának molekuláris adatokat is felhasználó felméréséhez. Három gombacsoportot vizsgáltunk:

Tuber Az egyik leggyakoribbnak tartott mikorrhizás gombanemzetség morfológiailag hasonló karakterű, a Kárpát-medencében is honos fajainak morfológiai bélyegekre, illetve az ITS szekvenciákon alapuló filogenetikai adatokra épülő rokonsági szálainak felderítése volt a célunk. Választ kerestünk arra a két évszázados kérdésre is, mely mikroszkopikus tulajdonságokat tekinthetjük relevánsnak a határozásnál, illetve elkülöníthetők-e földrajzilag egyes taxonok. Különös figyelmet kapott a *Tuber rapaeodorum* Tul. & C. Tul., vagyis a mustárszagú szarvasgomba, az a faj, amely talán a legtöbb vitát váltotta ki a gombataxonómusok közt. Jelen vizsgálatok több lábon álló, megalapozott eredményeket biztosítanak a *Tuber* fajok későbbi monográfiáinak megszerkesztéséhez is.

Melanogaster Ennél a mikorrhizás, ám a *Tuber*-nél ritkább nemzetségnél igyekeztünk a hozzáférhető valamennyi (mintegy 240) Kárpát-medencei herbáriumi anyagról mikroszkopos jellemzést készíteni, és lehetőség szerint eldönteni, hogy az irodalomban általánosan előforduló spóraméreten és -alakon alapuló fajkonceptiók helytállóak-e vagy sem. A karakterisztikus és kétes anyagok ITS szekvenciáinak összehasonlítását is elvégeztük abból a célból, hogy kimutathatók-e kriptikus fajok, netán a Botanikai Nevezéktan Nemzetközi Kódexében szereplő taxonok egy része is csak morfológiai fajnak tekinthető, tehát csak morfológiai különbséget mutatnak-e.

Hygrocybe A szaprobionta életmódot folytató, élénk szinkavalkádú nedűgomba nemzetség legtöbb fájának élőhelyei veszélyeztetettek, mivel a talajtani jellemzők összetételének változásaira igen érzékenyen reagálnak. Fő célunk a nehezen határozható fajok, fajcsoportok ITS szekvenciákon alapuló elkülöníthetőségének felderítése volt, elsősorban a Kárpát-medencei fajokra koncentrálván. Választ vártunk arra a kérdésre is, vajon a *Hygrocybe* fajok rendkívüli változatossága mögött meghúzódik-e valamilyen genetikai motívum, vagy a feltűnő morfológiai jegyek alapján történt határozás esetleg félrevezető lehet.

Anyag és módszer

A morfológiai és molekuláris vizsgálatokat mindhárom nagygombanemzetség esetében Kárpát-medencei gyűjtőterületről (jórészt a mai Magyarország, Románia illetve elvéve Ausztria területéről) származó, herbáriumi példányok mintáin folytattuk le. A morfológiai és molekuláris vizsgálatokra lehetőleg a gazdag, érett, fertőzésmentes anyagokat választottuk ki. A nemzetségtől függően eltérő, érdemi morfológiai határozóbélyegeket mikroszkópi analíziséhez Nikon Optiphot-2 és Nikon Eclipse 800 kutatómikroszkópokat Nomarski DIC feltétellel illetve Nikon SMZ-U sztereomikroszkópot alkalmaztunk, a szárított minták vízben történő rehidratálását követően.

Az elemzésre szánt minták és a választott módszerek részletes kifejtése – ahol szükséges, nemzetségre is lebontva – a következőkben kerül bemutatásra.

A kísérleti anyag és a gombacsoportok morfológiai jellemzésének szempontjai

Tuber nemzetség

Minden esetben termőtestet vizsgáltunk, melyek a Kárpát-medence területéről történő gyűjtésekből származtak az 1990-2000 közötti évtizedből. A szárított termőtestek az Első Magyar Szarvasgombász Egyesület herbáriumába kerültek, ahol tárolásuk szakszerűen történt, elkerülve az állagromlást, felülfertőződést. A herbáriumi anyagok, a műtermékeket elkerülendő, vegyszeres kezelésben nem részesültek. A minták földrajzi lelőhelyét az 1. táblázat sorolja fel. A típusanyagok tanulmányozását James M. Trappe végezte (Halász és mtsai, 2005). Fajleírások: A herbáriumi mintákat Castellano és mtsai (1989) valamint Trappe és Castellano (2000) előírásai szerint jellemeztük. A színárnyalatok az edinburgh-i Királyi Botanikus Kert Colour Identification Chart (CIC, 1969) című kiadványa alapján kerültek meghatározásra.

A mikroszkópos határozásokhoz a következő tulajdonságokat vizsgáltuk:

- peridium szerkezete és vastagsága a felszínre merőleges metszést követően;
- aszkuszonkénti spóraszám megállapítása legalább 100, véletlenszerűen kiválasztott, érett aszkuszból (az üres vagy éretlen spórát tartalmazó aszkuszokat kizártuk a számolásból);

- spórák hosszúság/szélesség aránya ornamentáció nélkül, 1- és 4-spórás aszkuszkokban: legalább 10 mérés esetenként, Gross (1987) szerint;
- a spórákat díszítő hálózatos ornamentáció egyes hálószeleinek átmérője (mérés: a spóra legnagyobb szélességénél, legalább 10 spórából számolt adat átlagában);
- a dermatocisztidák relatív gyakorisága, hossza, az alapnál mért szélessége és szeptumainak száma.

1. táblázat A morfológiai és molekuláris vizsgálatra kiválasztott *Tuber* minták lelőhelyének, herbáriumi számának és az INSD hivatkozási számának összefoglalása.

Fajnév	Lelőhely	Herb. szám	Acc. number
<i>T. puberulum</i>	Nagykörös	ZB-1553.	AJ557530
<i>T. puberulum</i>	Nagykörös	ZB-1554.	AJ557531
<i>T. puberulum</i>	Budapest	ZB-1576.	AJ557532
<i>T. puberulum</i>	Tahi	ZB-2658.	AJ557533
<i>T. puberulum</i>	Bajánsenye	ZB-436.	AJ557534
<i>T. puberulum</i>	Pilisszentkereszt	ZB-468.	AJ557535
<i>T. puberulum</i>	Tardosbánya	ZB-445.	AJ557536
<i>T. puberulum</i>	Abaliget	ZB-32.	AJ557537
<i>T. puberulum</i>	Ganna	ZB-1076.	AJ557538
<i>T. foetidum</i>	Szigetújfalu	ZB-2489.	AJ557544
<i>T. foetidum</i>	Garé	ZB-2452.	AJ557543
<i>T. maculatum</i>	Jásztelek	ZB-2569.	AJ557516
<i>T. maculatum</i>	Újszász	ZB-2353.	AJ557517
<i>T. maculatum</i>	Aszód	ZB-2656.	AJ557518
<i>T. maculatum</i>	Bátorliget	ZB-224.	AJ557519
<i>T. maculatum</i>	Szeged	ZB-1079.	AJ557520
<i>T. maculatum</i>	Karcag	ZB-1682.	AJ278140
<i>T. borchii</i>	Kétvölgy	ZB-433.	AJ557541
<i>T. borchii</i>	Rugonfalva (RO)	ZB-1320.	AJ557540
<i>T. borchii</i>	Nagyegyháza	ZB-1481.	AJ557542
<i>T. rapaeodorum</i>	Felsőszentmárton	ZB-2113.	AJ557523
<i>T. rapaeodorum</i>	Balatonfenyves	ZB-305.	AJ557525
<i>T. rapaeodorum</i>	Ocsa	ZB-2657.	AJ557526
<i>T. rapaeodorum</i>	Tompa	ZB-1226.	AJ557527
<i>T. rapaeodorum</i>	Jászszenklászló	ZB-1284.	AJ557524
<i>T. rapaeodorum</i>	Szilvágy	ZB-1360.	AJ557522
<i>T. rapaeodorum</i>	Szilvásvár	ZB-1965.	AJ557528
<i>T. rapaeodorum</i>	Kemence	ZB-1713.	AJ557529
<i>T. rapaeodorum</i>	Siménfalva (RO)	ZB-2139.	AJ557521
<i>T. sp. aff. scruposum</i>	Lakitelek	ZB-1667.	AJ557539
<i>T. excavatum</i> (outgroup)	Miskolcápolca	ZB-2597.	AJ557545

Melanogaster nemzetség

A Kárpát-medencéből származó és herbáriumokban hozzáférhető összes *Melanogaster* anyag morfológiai alapon történő revízióját elvégeztük, majd a karakterisztikus mintákat molekuláris biológiai módszerrel elemeztük. A ITS vizsgálatba bevont minták főbb jellemzőit a 2. táblázatban tüntettük fel. A mikroszkópos határozásokhoz az irodalmi adatoknak megfelelően legfontosabb bélyegnek a spórák alakját és méretét tekintettük. Mintánként tíz, véletlenszerűen kiválasztott, érett és ép spórát mértünk le, a spóraméréseknél az apiculus és sterigma nélküli spórahosszt vettük figyelembe. A mérésekből származó adatokat Simonini (2001) módszerét követve, grafikonon ábrázoltuk (12. ábra). Az egyes minták spóraszélességeinek átlagát a spórahosszak átlagainak függvényében vettük fel, majd jelöltük az elkülöníthető csoportokat.

2. táblázat A molekuláris vizsgálatra kiválasztott *Melanogaster* minták gyűjtési helyének, idejének, herbáriumi számának és az INSD hivatkozási számának összefoglalása

Sorszám	Fajnév	Herb. szám	Lelőhely	Gyűjtési idő	Acc. number
Mg1	<i>M. ambiguus</i>	ZB. 2220	Bogdása	1999. 10. ?	AJ555510
Mg2	<i>M. ambiguus</i>	BP-51.745	Bp.-Kamaraerdő	1975.	AJ555511
Mg3	<i>M. ambiguus</i>	ZB. 1599	Nyárlőrinc	1999. 06. 26.	AJ555512
Mg4	<i>M. ambiguus</i>	ZB. 1613	Pusztavacs	1999. 06. 20.	AJ555513
Mg5	<i>M. ambiguus</i>	ZB. 2409	Szilvásvár	2001. 10. 27.	AJ555514
Mg6	<i>M. cf. intermedius</i>	ZB. 1770	Bp.-Pestlőrinc	1999. 09. 15.	AJ555515
Mg7	<i>M. broomeianus</i>	BP-48.353	Bp.-Hűvösvölgy	1969. 08. 04.	AJ555516
Mg8	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 1616	Bagolyirtás	1999. 07.	AJ555517
Mg9	<i>M. broomeianus</i>	BP-23.633	Kecskemét-Nyír	???? 07.	AJ555518
Mg10	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 2079	Jászszenzlászló	1998.	AJ555519
Mg11	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 2315	Kunbaracs	2001. 08. 02.	AJ555520
Mg12	<i>M. cf. ambiguus</i>	BP-48.368	Hárskút	1967. 06. 17.	AJ555521
Mg13	<i>M. variegatus</i>	BP-23.640	Szigetszentmiklós	1930. 05. 29.	AJ555522
Mg14	<i>M. variegatus</i>	ZB. 1438	Algyó	1998. 10.	AJ555523
Mg15	<i>M. variegatus</i>	ZB. 1688	Gánt	1999. 08. 03.	AJ555524
Mg16	<i>M. vittadinii</i>	BP-33.090	Pilisszentkereszt	1959. 05. 31.	AJ555525
Mg17	<i>M. macrosporus</i>	ZB. 489	Szombathely	1995. 06.	AJ555526
Mg18	<i>M. cf. tuberiformis</i>	ZB. 1295	Sepsiszentgyörgy	1997. 10.	AJ555527
Mg19	<i>M. cf. macrosporus</i>	ZB. 2254	Hangony	2001. 05. 21.	AJ555528
Mg20	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 347	Bódvaszilas	1990. 07. 11.	AJ555529
Mg21	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 2331	Szelcepuszta	2001. 08. 25.	AJ555530
Mg22	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 2348	Kunbaracs	2001. 09. 01.	AJ555531
Mg23	<i>M. broomeianus</i>	ZB. 2521	Taksony	2002. 06. 14.	AJ555532
Mg24	<i>M. variegatus</i>	ZB. 1225	Balotaszállás	1997. 07. 30.	AJ555533
Mg25	<i>M. variegatus</i>	ZB. 1348	Szarvas	1998. 06. 12.	AJ555534
Mg26	<i>M. variegatus</i>	ZB. 2312.	Pilis-hg.	2001. 07. 15.	AJ555535
outgroup	<i>Alpova diplophloeus</i>	-	Ausztria	?	-
outgroup	<i>Paxillus involutus</i>	SE05091402	INSD	-	EU078734
outgroup	<i>Paxillus involutus</i>	SE03100403	INSD	-	EU078741

Hygrocybe nemzetség

A vizsgálatokhoz különböző magyarországi herbáriumok (Zagyva T., Albert L. és Finy P. magángyűjteményei) exszikkátumait használtunk fel, illetve néhány mintát a Bécsi Természettudományi Múzeum szolgáltattot. A minták nagyobb része a magyarországi Őrségi Nemzeti Park területéről (Apátistvánfalva, Farkasfa, Felsőszőlnök, Kétvölgy) származik.

Az ITS szekvenciaanalízis céljából kiválasztott minták morfológiai alapon történő taxonómiai besorolása, INSD azonosítója, valamint gyűjtési helye a 3. táblázatban lett feltüntetve. A termőtesteket az 1997-2002. évek folyamán, június és október között gyűjtötték. A begyűjtött minták határozását Zagyva T., Albert L. és Finy P. (Magyarország) valamint H. Pidlich-Aigner (Ausztria) végezte, a kétes anyagokat mikroszkópos vizsgálattal zártuk ki a további vizsgálatokból. A határozásnál figyelembe vett ill. vehető legfontosabb jellemzőket – a téma összetettségénél fogva – részletesen a diszkusszióban tárgyaljuk.

A magyarországi *Hygrocybe* minták lelőhelye nagytájanként:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| I. Dunántúli-dombság | Őrség: Farkasfa
Vendvidék: Felsőszőlnök, Kétvölgy, Apátistvánfalva |
| II. Alföld | Mezőföld: Székesfehérvár-Sóstó
Kiskunság: Kunbaracs |
| III. Dunántúli-középhegység | Pilis: Budakalász
Budai-hegység: Budakeszi, Köves-bérc (Budapest) |
| IV. Északi-középhegység | Bükk: Bükkszentkereszt, Perecse
Zempléni-hegység: Lászlótanya |
| Külföldi lelőhelyek: | |
| Ausztria: | Alsó-Ausztria: Feldbach, Puchberg |

3. táblázat. A munkában felhasznált *Hygrocybe* minták morfológiai alapon történt rendszertani besorolása, gyűjtési helye és INSD azonosítója.

Sorszám	Fajnév	Termőhely	Acc. number
H1	<i>H. persistens</i> var. <i>persistens</i> (Britzelm.) Singer	Kétvölgy	FM208852
H2	<i>H. citrinovirens</i> (J.E. Lange) Jul. Schäff.	Felsőszőlőnk	FM208853
H3	<i>H. calyptriformis</i> (Berk.) Fayod	Kétvölgy	FM208854
H4	<i>H. chlorophana</i> (Fr.) Wünsche	Felsőszőlőnk	FM208855
H5	<i>H. chlorophana</i> (Fr.) Wünsche	Felsőszőlőnk	FM208856
H6	<i>H. chlorophana</i> (Fr.) Wünsche	Kétvölgy	FM208857
H7	<i>H. chlorophana</i> (Fr.) Wünsche	Kétvölgy	FM208858
H8	<i>H. coccinea</i> (Schaeff.) P. Kumm.	Kétvölgy	FM208859
H9	<i>H. conica</i> var. <i>conicoides</i> (P.D. Orton) Boertm.	Székesfehérvár	FM208860
H10	<i>H. conica</i> var. <i>conicoides</i> (P.D. Orton) Boertm.	Székesfehérvár	FM208861
H11	<i>H. conica</i> var. <i>conicoides</i> (P.D. Orton) Boertm.	Székesfehérvár	FM208862
H12	<i>H. coccinea</i> (Schaeff.) P. Kumm.	Felsőszőlőnk	FM208863
H13	<i>H. quieta</i> (Kühner) Singer	Felsőszőlőnk	FM208864
H16	<i>H. cantharellus</i> (Schwein.) Murrill	Farkasfa	FM208865
H17	<i>H. miniata</i> (Fr.) P. Kumm.	Pilis	FM208866
H18	<i>H. miniata</i> (Fr.) P. Kumm.	Budakeszi	FM208867
H19	<i>H. virginea</i> var. <i>fuscescens</i> (Bres.) Arnolds	Székesfehérvár	FM208868
H20	<i>H. virginea</i> var. <i>virginea</i> (Wulfen) P.D. Orton & Watling	Székesfehérvár	FM208869
H21	<i>H. virginea</i> var. <i>ochraceopallida</i> (P.D. Orton) Boertm.	Budapest	FM208870
H22	<i>H. persistens</i> var. <i>persistens</i> (Britzelm.) Singer	Székesfehérvár	FM208871
H23	<i>H. persistens</i> var. <i>persistens</i> (Britzelm.) Singer	Kétvölgy	FM208872
H24	<i>H. virginea</i> var. <i>ochraceopallida</i> (P.D. Orton) Boertm.	Kétvölgy	FM208873
H26	<i>H. pratensis</i> var. <i>pratensis</i> (Pers.) Bon	Kétvölgy	FM208874
H27	<i>H. psittacina</i> var. <i>psittacina</i> (Schaeff.) P. Kumm.	Kétvölgy	FM208875
H29	<i>H. punicea</i> (Fr.) P. Kumm.	Apátistvánfalva	FM208876
H30	<i>H. quieta</i> (Kühner) Singer	Bükkszentkereszt	FM208877
H31	<i>H. conica</i> var. <i>conica</i> (Scop.) P. Kumm.	Székesfehérvár	FM208878
H32	<i>H. spadicea</i> var. <i>spadicea</i> (Scop.) P. Karst.	Kétvölgy	FM208879
H34	<i>H. conica</i> var. <i>conica</i> (Scop.) P. Kumm.	Kétvölgy	FM208880
H35	<i>H. irrigata</i> (Pers.) Bon	Kétvölgy	FM208881
H36	<i>H. conica</i> var. <i>conica</i> (Scop.) P. Kumm.	Székesfehérvár	FM208882
H37	<i>H. ceracea</i> (Wulfen) P. Kumm.	Budakalász	FM208883
H38	<i>H. cantharellus</i> (Schwein.) Murrill	Lászlótanya	FM208884
H39	<i>H. nitrata</i> (Pers.) Wünsche	Lászlótanya	FM208885
H40	<i>H. miniata</i> (Fr.) P. Kumm.	Budakalász	FM208886
H41	<i>H. laeta</i> var. <i>laeta</i> (Pers.) P. Kumm.	Budakalász	FM208887
H43	<i>H. intermedia</i> (Pass.) Fayod	Perecse	FM208888
H44	<i>H. citrinovirens</i> (J.E. Lange) Jul. Schäff.	Perecse	FM208889
H47	<i>H. laeta</i> var. <i>laeta</i> (Pers.) P. Kumm.	Feldbach (A)	FM208890
H48	<i>H. lacmus</i> (Schumach.) P.D. Orton & Watling	Feldbach (A)	FM208891
H49	<i>H. splendidissima</i> (P.D. Orton) M.M. Moser	Felsőszőlőnk	FM208892
H51	<i>H. persistens</i> var. <i>konradii</i> (R. Haller Aar.) Boertm.	Kunbaracs	FM208893
H52	<i>H. pratensis</i> var. <i>pallida</i> (Cooke) Arnolds	Kétvölgy	FM208894
H53	<i>H. psittacina</i> var. <i>psittacina</i> (Schaeff.) P. Kumm.	Apátistvánfalva	FM208895
H54	<i>H. flavipes</i> (Britzelm.) Arnolds	Puchberg (A)	FM208896
H55	<i>H. colemaniana</i> (A. Bloxam) P.D. Orton & Watling	Puchberg (A)	FM208897
H57	<i>H. punicea</i> (Fr.) P. Kumm.	Felsőszőlőnk	FM208898
H58	<i>H. turunda</i> sensu Lange (Fl. Ag. Dan. 5: 27 & pl. 168H)	Farkasfa	FM208899
	<i>Humidicutis marginata</i>	INSD	DQ490625
	<i>Hygrocybe canescens</i>	INSD	DQ486685
outgroup	<i>Lactarius scrobiculatus</i>	INSD	AF140263
outgroup	<i>Lactarius quieticolor</i>	INSD	AF140269
outgroup	<i>Lactarius semisanguifluus</i>	INSD	AF140268

A kísérleti anyag molekuláris vizsgálatának lépései

A minták előkészítése

A DNS kinyerésében néhány módosítással Káren és mtsai (1997) módszerét alkalmaztam, amely Gardes és mtsai (1991), ill. Henrion és mtsai (1992) metodikáján alapul. Az exszikkátumokból mintegy 2-5 mg-ot használtunk fel DNS-kivonás céljára. A minták aprítása szárazon történt. A szennyeződést elkerülendő, a mintáknak olyan darabkáját választottuk ki, mely színében és szerkezetében látható mértékben nem ment át elváltozáson, mikroszkóp alatt nem voltak észlelhetők benne idegen gombaspórák, valamint nem közvetlenül a szárítmány felszínén helyezkedett el. Gaszteroid termőtest esetében – saját tapasztalat szerint – legalkalmasabb a perídium belső rétegéből vagy a gleba steril hifákat tartalmazó részéből venni a mintát, a viszonylag vastag falú, érett spórákat ugyanis körülményes feltárni. Kalapos gombánál a kalap tönkkel szomszédos részéből vett álszövetet találtuk a legcélravezetőbbnek, itt ugyanis a rövidebb hifák miatt egységnyi térfogatú vagy tömegű termőtestdarabka nagyobb mennyiségű DNS-t tartalmaz.

DNS izolálás

A porított, 2-5 mg-nyi termőtesteket kevés kvarchomok segítségével, 65 °C hőmérsékletű, 2%-os CTAB oldat 600 µl-ében, kisméretű dörzsmozsárban tartuk fel, majd 65 °C-on inkubáltuk 40 percen át. A sejtfal fragmentumait és egyéb szennyeződéseket 10000 x g, 10 perces centrifugálással távolítottuk el. Ezt követően, a felülúszóhoz 600 µl kloroformot pipettázva és alaposan összerázva, a mintából a fehérjék nagy része is kicsapódott és újabb centrifugálással (1000 x g, 15 min) kiülepíthetővé vált. A hatékonyabb fehérjementesítés érdekében a felülúszót előbbieik szerint ismételt kloroformos tisztításnak vetettük alá. Végül a NS-t 900 µl -20 °C-os abszolút etanollal denaturáltuk a felülúszóból. Két óráig, -20 °C-on történő inkubáció után a mintákat 10000 x g-n, 30 percig centrifugáltuk, a DNS csapadékot 200 µl 70 %-os, -20 °C-os etanollal kétszer mostuk, majd a csapadékot kiszárítottuk és 20-70 µl steril Milli-Q vízben oldottuk vissza.

A nukleinsav-kivonás minőségének ellenőrzése gélelektroforézissel

A kivonat nukleinsav-mintázatának vizualizálásához agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk, ehhez a Gibco BRL cég Horizon 11-14 típusú futtató rendszerét használva. A futtató puffer Trisz-bórsav-EDTA (TBE) puffer volt, a gél összetétele 1% agaróz, TBE

pufferben oldva, melyhez az etidium-bromidot 85 ng/ml koncentrációban alkalmaztunk (0,5 mg/ml törzsoldatából 17 µl térfogatban 100 ml gélhez).

Géldokumentáció

A futtatás után a gél, UV fényrel átvilágítva, 595±50 nm hullámhosszon áteresztő szűrőt alkalmazva, hűtött CCD kamerával fényképeztük le, a WinView/32 kameravezérlő program segítségével. A fotók kiértékelése a Phoretix-1D gélkiértékelő program felhasználásával történt.

PCR reakció

Az idegen szervezetet is tartalmazó, szennyezett anyagból meg lehet valósítani az amplifikációt, azonban el kell választani a többféle PCR terméket egymástól. Ez elvégezhető például a kapott termékek klónozásával, vagy specifikus primerek használatával. A *Melanogaster*-ekkel történő munka során olyan reverse primert terveztünk, mely az összes *Melanogaster* fajra használható, még a közel rokon taxonómiai csoportok ITS régiójához sem köt, valamint az ITS-2 szakasz 3'-végén található utolsó 4 és az azt követő 17 bázissal komplementál, így a teljes ITS régió amplifikálására alkalmas. Sok minta DNS tartalma meglehetősen alacsony volt, így egyszeri amplifikáció nem mindig hozta meg a kellő eredményt. A probléma kiküszöbölése érdekében nested és semi-nested PCR-t alkalmaztunk, ahol az egymásra épülő reakciók szinte kivétel nélkül eredményre vezettek. A használt primerek a következők voltak (4. táblázat):

4. táblázat Az ITS régiók amplifikálására alkalmazott primerek.

kód	típus	szekvencia	Hivatkozás
NS5	Forward primer	5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	White és mtsai, 1990
ITS1F	Forward primer	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	Gardes és Bruns, 1993
ITS1	Forward primer	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White és mtsai, 1990
MGR1	Reverse primer	5'-CTGATTGAGGTCAAGCGTCA-3'	saját
ITS4	Reverse primer	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White és mtsai, 1990
ITS4B	Reverse primer	5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'	Gardes és Bruns, 1993

A használt forward primerek a 18S rRNS-t kódoló régió 3'- végéhez közeli részéhez kapcsolódnak, a reverse primerek pedig a 25S rRNS-nek megfelelő szakasz ITS-2 régióhoz közel eső szakaszával komplementálnak.

A DNS-kivonatból az előzetes eredmények szerint szükséges mennyiséget használtunk templátként az amplifikációhoz. Gyakran a DNS-kivonat 10-1000-szeres hígítására is szükség volt, ebből mértünk ki egy olyan sorozatot, amely elég széles intervallumát képviselte a DNS mennyiségének. Erősen fragmentált DNS-t mutató gélekép esetén nagyobb térfogat használata vált szükségessé.

Az amplifikációhoz a Perkin Elmer cég GeneAmp PCR System 2400 típusú készülékét alkalmaztuk. A PCR elegyek végső térfogata minden esetben 50 µl volt, a mastermix-ekhez a Zenon Bio által gyártott Dupla-Taq™ enzim kitjét használtuk. Az elegyek összetételét az alábbi, 5. táblázat foglalja össze:

5. táblázat Az ITS régiók amplifikálására választott PCR reakcióelegyek általános összetétele

Törzsszoldat	Kiindulási koncentráció	Bemérési térfogat
10x reakciópuffer (Zenon Bio)	(15 mM MgCl ₂)	5,0 µl
dNTP mix	4×2 mM	5,0 µl
primer1 (forward)	0,01 mM	1,0 µl
primer2 (reverse)	0,01 mM	1,0 µl
MgCl ₂ (Zenon Bio)	25 mM	2,5 µl
steril Milli-Q víz	-	10,25 µl
Dupla-Taq™ polimeráz (Zenon Bio)	1,25 unit	0,25 µl
templát DNS + steril Milli-Q víz	változó	25,0 µl

A reakció során változtatott paraméterekről a 6. táblázat nyújt tájékoztatót:

6. táblázat Az ITS amplifikáló reakció folyamán alkalmazott PCR-program beállításai

Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Primerkötés	DNS szintézis	Végső szintézis
94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C
7 min 30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	7 min

A polimeráz enzim aktiválásához és a templát DNS előzetes denaturációjának elérése céljából az első ciklus beindítása előtt 7,5 percig tartó 94°C-os inkubációt alkalmaztunk. Amennyiben az első amplifikációt továbbiak követték, az újabb PCR-ekhez az előző PCR termékből 1-1,5 µl-t használtunk fel templátként, és a PCR reakcióelegy összeállítása az előbb leírtakhoz hasonló módon történt. A reakció végeztével (30-35 ciklus) a termék(ek) vizsgálatát a DNS kivonás eredményéhez hasonlóan (1 %-os agaróz 1xTBE-ben) agaróz gélelektroforézissel kiviteleztük.

PCR-termék tisztítása és szekvenáló reakció

A PCR-termékek tisztításához a BioRad cég Prep-A-Gene Kit-jét alkalmaztuk, a termékleírás utasításainak megfelelően.

A szekvenáló reakcióhoz a Perkin Elmer cég által forgalmazott BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit-et használtuk. A szekvenáló reakcióelegy (20 µl) a következő összetevőket tartalmazta:

szekvenáló kit	4 µl
hígítópuffer	2 µl
steril Milli-Q víz	5-9 µl
primerek	1-1 µM
DNS-templát	4-8 µl

A szekvenálási eredmény megbízhatóságának növelése érdekében minden mintából készítettünk egy forward és egy reverse primert tartalmazó elegyet, így a szekvenálást követően a szekvenciapárok egymással kiegészíthetők. Ezután a PCR-készülék segítségével amplifikáltuk az adott DNS-szakaszt. A szekvenáló reakció során (7. táblázat) 28 ciklust alkalmaztunk.

7. táblázat A szekvenáló reakció folyamán alkalmazott PCR-program beállításai

Denaturáció	Primerkötés	DNS szintézis	Eltartás
96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
10 sec	5 sec	4 min	

A szekvenáló reakció 20 µl térfogatú termékeit 50 µl 96 %-os etanolt és 2 µl 3M Na-acetátot tartalmazó elegyet hozzáadva tisztítottuk. Centrifugálást követően (20 perc, 10000 x g, 4 °C) a csapadékot 250 µl 70 %-os etanollal kétszer mostuk, majd kiszárítottuk.

A szekvenátorba való behelyezés előtt a kiszárított mintákat 17µl TSR-pufferben (Template Suppression Reagent, PE Applied Biosystems) vettük fel és 95°C-on 3 percig tartó denaturálásnak vetettük alá. A szekvenálás ABI PRISM 310 illetve ABI PRISM 3100 Genetic Analyser készülékekkel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) történt.

Szekvenciaanalízis

Tuber

Külcsoport (outgroup) kiválasztása: *Tuber excavatum* teljes ITS szekvenciáját alkalmaztuk külcsoportként a filogenetikai analízis megvalósíthatósága érdekében.

Filogenetikai analízis: *T. excavatum* outgroup-ot is beleértve, 589 nukleotid hosszúságú DNS-szakaszt vontunk be az analízis alapját képező szekvencia-összevetésbe, az alignment-be, mely magába foglalta az ITS1, 5,8S rRNS és ITS2 szakaszokat. Az összevetés során keletkező nukleotidhiányok, a gap-ek további kezelése, az analízis során való számszerűsítésük kétféle módon történt:

- A) Minden karaktert bevontunk az összevetésbe, a gap-eket hiányzó adatként kezeltük;
- B) A sok bázisra kiterjedő inszerciákat/deléciákat kizártuk az összevetésből. Ez különösen a hosszú delécióval rendelkező taxonok (*T. puberulum* és *T. aff. scruposum*) esetében volt elkerülhetetlen.

A szekvenciák összevetése a CLUSTALW2 (Larkin és mtsai, 2007) program segítségével történt. A szomszédcsatolásos (neighbor-joining, NJ) eljárással, „A” gap-kezeléssel készült fát a MEGA4 (Tamura és mtsai, 2007) programmal kivitelezttük. A távolságmátrixot a „Maximum Composite Likelihood” modell szerint alkottuk a molekuláris adatokból, az egyes ágak „valóságossága” bootstrap analízissel lett megbecsülve (Felsenstein, 1985), 1000 heurisztikus ismétlésből. A távolságmátrixot a molekuláris adatokból alkottuk, a „Maximum Composite Likelihood” modell szerint.

A „legnagyobb takarékoság” (Maximum Parsimony, MP) módszerrel (Eck és Dayhoff, 1966), „B” gap-kezeléssel készített filogenetikai fát a fenti programmal kivitelezttük. A keresési opció heurisztikus keresés volt a „Close-Neighbor-Interchange” (CNI) algoritmussal (Nei és Kumar 2000) Kiindulási fák a CNI módszer számára random szekvencia-hozzáadással, 10 ismétléssel történtek, az illesztési hézagok és hiányzó adatok

kezelése az összes karakter megtartásával történt. Az elágazások valóságossága itt is 1000 heurisztikus ismétlésből álló bootstrap analízissel készült.

Melanogaster

Outgroup kiválasztása: *Alpova diplophloeus* és *Paxillus involutus* teljes ITS szekvenciáját alkalmaztuk külcsoportként a filogenetikai analízis megvalósíthatósága érdekében.

Filogenetikai analízis: az outgroup-okat is beleértve, 589 nukleotid hosszúságú DNS-szakaszt vontunk be az összehasonlító analízis alapját képező szekvencia-illesztésbe (alignment), mely magába foglalta az ITS1, 5,8S rRNS és ITS2 szakaszokat. A szekvenciák illesztése a CLUSTALW2 (Larkin és mtsai, 2007) program segítségével történt. A szomszédcsatolós (neighbor-joining, NJ) eljárással készült fát a MEGA4 (Tamura és mtsai, 2007) programmal kiviteleztük. A távolságmátrixot a „Maximum Composite Likelihood” modell szerint alkottuk a molekuláris adatokból. A gap-eket, hiányzó adatokat a „Complete Deletion” opcióval kezeltük. Az egyes ágak „valóságossága” bootstrap analízissel lett megbecsülve (Felsenstein, 1985), 1000 heurisztikus ismétlésből.

Hygrocybe

A filogenetikai analízishez felhasználtuk az INSD néhány *Hygrocybe* fajának teljes ITS szekvenciáját, melyeket szintén a 3. táblázatban soroltunk fel.

Outgroup kiválasztása: Az igen széttagolt *Hygrocybe* nemzetséghez *Lactarius quieticolor*, *L. scrobiculatus* és *L. semisanguifluus* teljes ITS szekvenciáját alkalmaztuk külcsoportként a filogenetikai analízis kivitelezéséhez.

Filogenetikai analízis: A *Hygrocybe* nemzetség részletes törzsfáinak megjelenítése több lépcsőben tűnt a leginkább áttekinthetőnek. Az első filogenetikai fa egy gyökér nélküli, radiális fa, melyen a saját *Hygrocybe* szekvenciáinkat tüntettük fel. A másik két fa filogram, melyeken külön ábrázoltuk a két egymástól távol eső csoportot. Mindhárom fa mely szomszédcsatolós eljárással készült, a MEGA4 program (Tamura és mtsai, 2007) segítségével. A távolságmátrix szerkesztéséhez a „Maximum Composite Likelihood” opciót választottuk. Az elágazások robusztusságát 1000 bootstrap ismétlésből számítottuk, és a csomópontok mellett tüntettük fel a százalékban kifejezett értékeit. A gap-eket, hiányzó adatokat a „Complete Deletion” opcióval kezeltük.

Fajszintű elválás vizsgálata

Az Irodalmi áttekintésben említett grafikus ábrázolást alkalmaztuk a három gombacsoport adataira, azonban a kategóratengelyen nem az eltérő nukleotidok számát, hanem az ITS régió azonos nukleotidjainak százalékban kifejezett arányát tüntettük fel. Ehhez az adatokat a CLUSTALW2 program segítségével határoztuk meg (Larkin és mtsai, 2007).

Eredmények

A morfológiai vizsgálatok eredményeit – ahol szükséges – táblázatos formában közöljük. Az ITS szekvenciaanalízis elemzését részletesen közöljük és a megadott paraméterekkel szerkesztett filogenetikai fákat is feltüntetjük. Mivel a három gombacsoport mintavétele és kezelése némileg eltér, nem uniformizált eredményeket adunk meg.

Tuber nemzetség

Morfológiai bélyegek és fajleírások

A vizsgált *Tuber* minták morfológiai bélyegeit a 8. táblázat foglalja össze. A fajkonceptiók a típusanyagok vizsgálatán alapulnak, amelyeket a táblázat ugyancsak feltüntet. Ennek alapján 6 fajt tudunk elkülöníteni: *T. borchii* (3 minta), *T. foetidum* (2), *T. maculatum* (6), *T. puberulum* (9), *T. rapaeodorum* (9), valamint egy kétséget kizáróan nem azonosított, ám a *T. scruposum*-mal sok bélyegben megegyező *Tuber* faj (1). Adataink néhány kivétellel jól illeszkednek a fajleírásokban megadott értékhatárok közé. Egy kivétel például a *T. borchii* belső peridiumrétegének szorosan összefonódó hifái: Mello és mtsai (2000) ezzel szemben a neotípust lazán fonódó hifákkal jellemzi, csakúgy, mint Hawker (1954) vagy Pegler, Spooner és Young (1993). Mindenesetre, ez a tulajdonság sok *Tuber* fajnál változik, és függhet a termőtest fejlődése alatt ható időjárási viszonyoktól is (Trappe, szóbeli közlés). A dermatocisztidák és a külső peridiumréteg vizsgálata sokkal megbízhatóbb eredményeket ad, bár a cisztidák is képesek idővel elkopni és eltűnni (Mello, Garnero és Bonfante, 2000), akárcsak idős *Tuber* mikorrhizákon megfigyelhető.

A *T. rapaeodorum* és *T. maculatum* közti minimális morfológiai különbségek problémát jelentenek a két faj elkülönítésénél, különösen annak a fényében, hogy a régebbi leírások nem típusokon alapultak. Ehhez kapcsolódva mindkét fajról részletes jellemzést közlünk, összefoglalva a típusanyagok és az újabb gyűjtesek tulajdonságait is. A makro- és mikroszkopikus jellemzés Castellano és mtsai (1989) valamint Trappe és Castellano (2000) szerint történt.

8. táblázat A vizsgált *Tuber* minták morfológiai bélyegei

Fajnév	Herb. szám	Felszín	Peridium vastagság (µm)	Pszudopar. sejtek 30 µm átmérőig	Külső excipulum	Prozenchim, izodiametrikus sejtcsoportokkal 10 µm-ig	Gyakoriság	Hossz	Alap szélesség	Szept. szám	Peridiális cisztidák	Felszín
				6—30								
<i>rapaeodorum</i>	<i>PC-TYPE</i>	<i>sima</i>	± 300	+			<i>kevés</i>	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-2139	<i>sima</i>	250-300	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1360	<i>sima</i>	350-400	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-2113	<i>sima</i>	250-300	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1284	<i>sima</i>	350-450	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-305	<i>sima</i>	450-600	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-2657	<i>sima</i>	500-600	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1226	<i>sima</i>	350-500	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1965	<i>sima</i>	250-300	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1713	<i>sima</i>	450-600	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	<i>TO-TYPE</i>	<i>sima</i>	300-400		3—6 (10)		hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	ZB-1682	<i>sima</i>	300-400		+		hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	ZB-2569	<i>sima</i>	400-500		+		hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	ZB-2353	<i>sima</i>	500-550		+		hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	ZB-2656	<i>sima</i>	400-550		+		hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	ZB-224	<i>sima</i>	500-600		+		hiányzik	-	-	-		-
<i>maculatum</i>	ZB-1079	<i>sima</i>	400-450		+		hiányzik	-	-	-		-
<i>borchii</i>	<i>TO-TYPE</i>	<i>sima</i>	500-600	8—40			<i>elszórtn</i>	-	-	-		-
<i>borchii</i>	ZB-1320	<i>sima</i>	100-150	+			nincs adat	-	-	-		-
<i>borchii</i>	ZB-433	<i>sima</i>	100-150	+			nincs adat	-	-	-		-
<i>borchii</i>	ZB-1481	<i>sima</i>	150-250	+			nincs adat	-	-	-		-
<i>puberulum</i>	<i>K-TYPE</i>	<i>sima</i>	200-400	5-15(30)			<i>gyakori</i>	50-85	6-9	0-4		durván szemcsés
<i>puberulum</i>	ZB-1553	<i>sima</i>	250-350	+			elszórtn	-	-	-		-
<i>puberulum</i>	ZB-1554	<i>sima</i>	300-400	+			nincs adat	-	-	-		-
<i>puberulum</i>	ZB-1576	<i>sima</i>	300-400	+			nincs adat	65-86	6-7	1-2		-
<i>puberulum</i>	ZB-2658	<i>sima</i>	200-300	+			gyakori	-	-	-		-
<i>puberulum</i>	ZB-436	<i>sima</i>	150-200	+			nincs adat	66-115	5-9	1-3		durván szemcsés
<i>puberulum</i>	ZB-468	<i>sima</i>	200-250	+			gyakori	-	-	-		-
<i>puberulum</i>	ZB-445	<i>sima</i>	150-200	+			nincs adat	-	-	-		-
<i>puberulum</i>	ZB-32	<i>sima</i>	200-250	+			nincs adat	90-111	4-8	1-2		durván szemcsés
<i>puberulum</i>	ZB-1076	<i>sima</i>	150-200	+			gyakori	-	-	-		-
<i>foetidum</i>	<i>TO-TYPE</i>	<i>szemölcsös nem rehidr.</i>	250-350	10—55			hiányzik	-	-	-		-
<i>foetidum</i>	ZB-2452	szemölcsös	200-300	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>foetidum</i>	ZB-2489	szemölcsös	200-300	+			hiányzik	-	-	-		-
<i>aff. scruposum</i>	ZB-1667	<i>sima</i>	300-350	+			gyakori	40-66	3	0-1		puha, vékony

Fajnév	Herb. szám	Belső exicipulum			Aszkuszonkénti sp. gyakoriság						Hálózatszám		Spórák 1-sp. aszsk.		Hossz: szél. arány 1-sp. aszsk.	Sp. térf.	
		Nincs	Lazán összefont	Szorosan összefont	1- sp.	2- sp.	3- sp.	4- sp.	5- sp.	6- sp.	# sp	Átm. µm	Hossz µm	Szél. µm		1-sp aszsk. µm ³	4-sp aszsk. µm ³
<i>rapaeodorum</i>	PC-TYPE				15	25	34	24	2	0	5—12	3—15	37-53	28-34	1,39	NA	NA
<i>rapaeodorum</i>	ZB-2139			+	15	25	27	29	3	0	3—6	7-79	49-53	32-37	1,49	31600	7200
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1360			+	14	20	30	30	5	1	4—7	6,60	43-52	28-34	1,51	24000	5600
<i>rapaeodorum</i>	ZB-2113			+	6	15	30	45	3	0	4—9	6,33	40-52	29-34	1,45	26400	7100
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1284			+	29	40	17	14	1	1	3—7	6,29	42-52	33-38	1,33	29000	6900
<i>rapaeodorum</i>	ZB-305			+	16	43	28	13	0	0	3—8	6,08	43-56	31-37	1,45	31800	8800
<i>rapaeodorum</i>	ZB-2657			+	6	19	31	43	1	0	5—9	5,74	50-54	32-37	1,47	33100	7700
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1226			+	23	28	24	23	1	0	4—7	6,76	45-50	32-37	1,38	30400	8000
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1965			+	10	19	33	34	4	0	4—6	6,54	48-60	29-35	1,68	29700	8000
<i>rapaeodorum</i>	ZB-1713			+	18	30	27	23	2	0	3—6	5,41	43-53	28-37	1,39	27200	7000
<i>maculatum</i>	TO-TYPE			+	7	26	40	26	1	0	5—12	5—12	43-60	32-37	1,45	NA	NA
<i>maculatum</i>	ZB-1682			+	15	30	33	20	2	0	4—8	6,85	45-57	32-40	1,49	31300	7900
<i>maculatum</i>	ZB-2569			+	8	12	25	44	9	2	4—7	6,96	44-53	27-32	1,54	24800	8400
<i>maculatum</i>	ZB-2353			+	14	19	30	35	2	0	4—7	6,42	44-50	30-36	1,46	25700	8200
<i>maculatum</i>	ZB-2656			+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7,14	NA	NA-	1,76	26300	6600
<i>maculatum</i>	ZB-2224			+	14	24	39	22	0	0	4—7	6,77	43-52	31-37	1,40	28400	9700
<i>maculatum</i>	ZB-1079			+	19	21	27	31	1	0	4—7	7,30	43-53	31-37	1,44	28100	8300
<i>borchii</i>	TO-TYPE		+		7	26	40	26	1	0	5—11	5—15	40-54	35-42	1,31	NA	NA
<i>borchii</i>	ZB-1320			+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7,57	43-58	37-47	1,18	42400	11900
<i>borchii</i>	ZB-433			+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4—8	6,79	46-57	35-42	1,35	42400	13000
<i>borchii</i>	ZB-1481			+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3—5	7,21	45-53	33-41	1,30	35800	13600
<i>puberulum</i>	K-TYPE			+	29	35	37	5	0	0	7—14	4—10	50-58	47-54	1,77	NA	NA
<i>puberulum</i>	ZB-1553		+		23	46	25	6	0	0	4—8	6,97	52-60	39-43	1,34	48100	13100
<i>puberulum</i>	ZB-1554		+		11	39	37	12	1	0	4—7	7,47	43-56	40-45	1,19	47500	14000
<i>puberulum</i>	ZB-1576		+		NA	NA	NA	NA	NA	NA	4—8	6,58	38-55	37-44	1,21	46500	13800
<i>puberulum</i>	ZB-2658		+		31	41	22	6	0	0	4—8	7,93	45-56	37-42	1,29	42400	12800
<i>puberulum</i>	ZB-436		+		NA	NA	NA	NA	NA	NA	4—9	5,77	43-53	31-43	1,25	34500	13900
<i>puberulum</i>	ZB-468		+		25	40	24	10	1	0	4—10	5,67	46-54	37-42	1,27	41600	11400
<i>puberulum</i>	ZB-445		+		25	43	29	3	0	0	4—7	7,69	49-61	37-46	1,29	47800	14500
<i>puberulum</i>	ZB-32		+		18	25	30	20	5	1	4—8	6,37	48-55	32-47	1,27	45100	14100
<i>puberulum</i>	ZB-1076		+		13	30	37	19	1	0	4—7	6,54	38-47	34-40	1,19	31100	9100
<i>foetidum</i>	TO-TYPE	+			30	34	26	5	5	0	3—6	4—20	40-50	31-36	1,25	NA	NA
<i>foetidum</i>	ZB-2452	+			16	19	23	35	6	2	2—5	9,39	42-48	33-37	1,31	28900	7000
<i>foetidum</i>	ZB-2489	+			7	29	32	31	2	0	3—6	7,36	34-43	26-32	1,37	18200	6400
<i>aff scruposum</i>	ZB-1667	+			20	27	39	14	1	0	5—9	5,57	47-55	28-30	1,71	23400	5900

Neotípus: *Tuber maculatum* Vittadini

A nem típusanyagok termőestei minden esetben tölgy fajok (*Quercus* spp.) alatt lettek begyűjtve. A termőestek hipogeikusak, gömbölydedek, több ponton nyíló sztereotécium felépítésűek. Átmérőjük legfeljebb 36 mm, színük fehértől a halványsárgás-krémszínűig változik (CIC3), halvány rózsás krémszín (CIC4), vagy halványokker, sötétebb alapi folttal és vörösesbarna foltokkal. A gleba kemény, színe a dohánybarnától (CIC17) a sötét bíborbarnáig terjed, átszöve vékony, fehéres erekkel. Illata retekre emlékeztet, később kellemetlenné válik. Íze nem jellemző, de az irodalmi adatok többségével ellentétben nem keserű. Felülete sima, hiányoznak a dermatocisztidák. A perídium 300-600 µm vastag (száraz mintákon mérve). Külső rétege prozenchimatikus, köztük sokszögletű vagy kerek, 6-10 µm széles elemek kis csoportjaival. A sejtek fala legfeljebb 2 µm. A belső réteg hifái vékony falúak (1 µm-ig), hialinok, szorosan összefonódtak, átmérőjük 4-6 µm. A termőrétegtartó és a medulláris excipulum szorosan összefonódott, hialin hifákból áll, hasonlóan a perídium belső rétegéhez. Az aszkuszkok gömbölydedek vagy ellipszoidok, rövid nyelűek, 65-95 x 45-75 µm-esek, a faluk éretten kb. 1 µm vastag, hialin, inamiloid, bennük 1-6 spóra fejlődik. Parafízisek nincsenek. A különböző spóraszámú aszkuszkok eloszlása: 1-spórás: 7-19 %, 2-spórás: 12-30 %, 3-spórás: 25-40 %, 4-spórás: 20-44 %, 5-spórás: 0-9 %, 6-spórás: 0-2 %. A spórák ellipszoidok, sárgásbarnák, méretük (ornamentika nélkül) az 1-spórás aszkuszkokban 40-57 x 27-40 µm, 2-spórás aszkuszkokban 33-43 x 24-32 µm, 3-spórásban 31-38 x 22-29 µm, 4-spórásban 25-36 x 19-26 µm, 5-spórás aszkuszkokban 28-35 x 20-27 µm. A spórák hosszúság/szélesség aránya 1-spórás aszkuszkokban 1,23-1,67; 2-spórásokban 1,25-1,55; 3-spórásokban 1,24-1,64; 4-spórásokban 1,14-1,53; 5-spórásokban pedig 1,26-1,57. A spóra-ornamentika 2-5 µm magas, a hálózati szemei 5-6 oldalúak; a spóra hossztengelyén 4-8(12) szem helyezkedik el, szélétben 3-6(7). A spórafal 1,5-2 µm vastag, áteső fényben a lencsehatás nem érvényesül. Melzer-reagensben a spórák barna színűek, cianofilek, az ornamentika hialin. Az exszikkátumok az Első Magyar Szarvasgombász Egyesület herbariumában érhetők el.

Holotípus: *Tuber rapaeodorum* Tul. et Tul.

A nem típusanyagok termőestei különböző lombhullató fák (*Salix*, *Populus*, *Fagus*, *Carpinus*, *Quercus*) alól lettek gyűjtve. A termőestek hipogeikusak, gömbölyűek vagy gömbölydedek, max. 25 mm átmérőűek, felépítésüket tekintve több ponton nyíló sztereotéciumok. Színük fehértől az okkeresig (CIC8) változhat, vagy okkersárga, sötétbarna foltokkal. A gleba kemény, vörösesbarna, dohánybarna (CIC17), melyet egyenes, fehéres

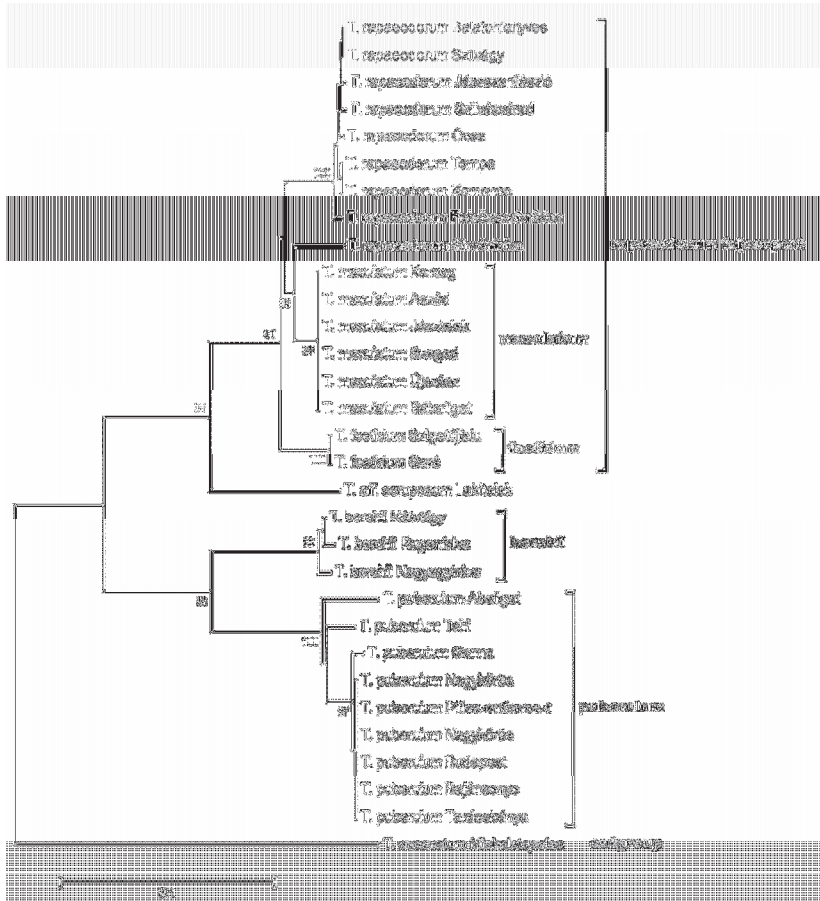
vagy halványokker erek járnak át. Illata torma, retekre emlékeztet, íze nem jellemző. A dermatocisztidák a magyarországi anyagokon hiányoznak, a holotípuson nagyon ritkásan találhatóak. Perídium 250-600 µm vastag, szárított mintából mérve. A külső réteg legfeljebb 100 µm vastag, 8-30 µm átmérőjű izodiametrikus sejtekből áll, melyeknek a megvastagodott fala 2 µm vastag is lehet. A perídium belső rétege hialin, szorosan egymásba fonódó, vékony falú (1µm-ig), 5-7µm széles hifákból áll. A trámát és a medulláris excipulumot szorosan összefonódó, hialin hifák alkotják, hasonlóak a perídium belső rétegében találhatóakhoz. Az aszkuszkok gömbölydedek vagy megnyúltak, 70-100 x 45-80 µm nagyságúak, rövid nyelűek, a faluk éretten 1 µm vastag, hialin, inamiloid, 1-6 spórát tartalmaz. A parafizisek hiányoznak. A különböző spóraszámú aszkuszkok eloszlása: 1-spóras: 6-29 %, 2-spóras: 15-43 %, 3-spóras: 17-34 %, 4-spóras: 13-45 %, 5-spóras: 0-5 %, 6-spóras: 0-1 %. A spórák ellipszoidok, sárgásbarnák, méretük (ornamentika nélkül) az 1-spóras aszkuszkokban 40-60 x 28-38 µm, 2-spóras aszkuszkokban 32-43 x 22-30 µm, 3-spórasban 27-41 x 18-27 µm, 4-spórasban 23-38 x 18-27 µm, 5-spóras aszkuszkokban 27-33 x 18-23 µm. A spórák hosszúság:szélesség aránya 1-spóras aszkuszkokban 1,19-1,85; 2-spórasokban 1,22-1,62; 3-spórasokban 1,16-1,72; 4-spórasokban 1,12-1,86; 5-spórasokban pedig 1,25-1,47. A spóraornamentika 3-6 µm magas, a hálózat szemei 5-7 oldalúak; a spóra hossz tengelyén 4-7(8) szem helyezkedik el, szélén 3-5(6). A spórafal 1,5-2 µm vastag, áteső fényben a lencsehatás nem érvényesül. Melzer-reagensben a spórák barna színűek, cianofilek, az ornamentika hialin. Az exszikkátumok az Első Magyar Szarvasgombász Egyesület herbáriumában érhetők el.

A szekvenciaanalízis eredményei

Összesen 31 *Tuber* mintából határoztunk meg teljes ITS szekvenciát. A nukleotidok száma az ITS-1 régió + 5,8S rRNS + ITS-2 régió tekintetében 450 és 583 között változott.

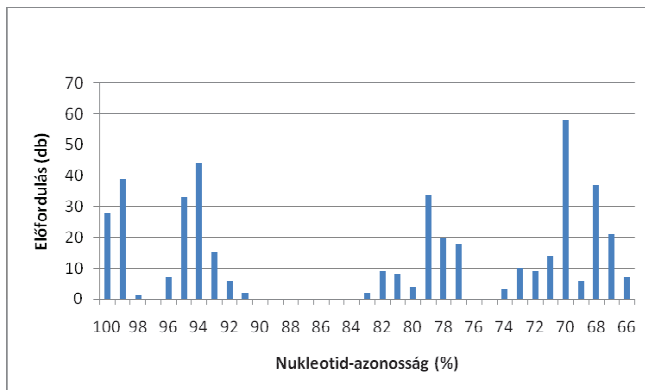
A fák topológiájában nem okozott eltérést a kétféle gap-kezelés. A morfológiailag meghatározott mintacsoportok (lényegében fajok) jól elkülönülnek a kladogramokon is (*T. maculatum*, *T. rapaeodorum*, *T. foetidum*, *T. puberulum*, *T. borchii*, valamint az ismeretlen *Tuber* faj). Minden csoporthoz tartozó bootstrap-érték igen magas, vagyis élesen elválnak a kládok. A *T. rapaeodorum* és *T. maculatum* csoportok összevetésekor is éles szétválást tapasztalunk, csak egyetlen minta (ZB-2139, Siménfalva) nem sorolható be igazán egyik csoportba sem. Ez a bizonyos minta közös kládot formál a *T. maculatum* mintákkal az „A” gap-kezelés során, illetve a másik esetben elkülönült ágat alkot, a fennmaradó *T. rapaeodorum* és *T. maculatum* mintáktól nagyjából azonos genetikai távolságra, bár alacsony,

70% alatti bootstrap értékkel. Az ismeretlen *Tuber* fajt reprezentáló minta a kétféle gap-kezelés során hasonló topológiájú fához vezetett, mindkét esetben magas bootstrap értékkel (3. ábra).



3. ábra *Tuber* ITS szekvenciák alapján készített filogenetikai fa. Szomszédcsatolási eljárással készült konszenzus törzsfa 31 taxon bevonásával. A fa szerkesztése, 1000 véletlenszerű ismétlést (bootstrap) figyelembe véve, a MEGA4 programcsomag „Neighbor-Joining” algoritmusának felhasználásával történt A 70 %-nál nagyobb bootstrap-értékek az elágazások mellett vannak feltüntetve. Az evolúciós mátrixot a ’Maximum Composite Likelihood’ opcióval számítottuk. Illesztési hézagok és hiányzó adatok kezelése: teljes törlés. A végső adatsor 399 pozíciót tartalmazott. Skála: nukleotidcserek száma pozíciónként.

A CLUSTALW2 algoritmust az egyes fajokon belüli szekvenciákra alkalmazva 93-100%-os azonosságokat tapasztaltunk. A *T. maculatum* esetében 100%-os hasonlóság mutatkozott a ZB-2569, ZB-1682, ZB-2353 és ZB-1079 minták között, míg a ZB-2656 szekvenciája mindössze 2-3 nukleotidban tért el a ZB-224-étől. 1-2% eltérés tapasztalható a *T. rapaeodorum* csoporton belül is, leszámítva a ZB-2139 mintát; a leginkább eltérő minta a ZB-2657 volt, míg a ZB-1226 és a ZB-1713 azonosnak adódott. A *T. puberulum* minták esetében hat szekvencia is megegyezett (ZB-445, ZB-468, ZB-436, ZB-1576, ZB-1553 és ZB-1554), a ZB-1076 minta pedig mindössze 2 nukleotidban tért el ezektől. Ezzel ellentétben akadtak minták (ZB-2658 és ZB-32), melyek igen nagy eltérést, akár 6-7%-ot is mutattak a többi szekvenciától (5. ábra). A *T. borchii* minták között 4-7 nukleotidnyi eltérés volt megfigyelhető, míg a két *T. foetidum* szekvencia teljesen megegyezett.

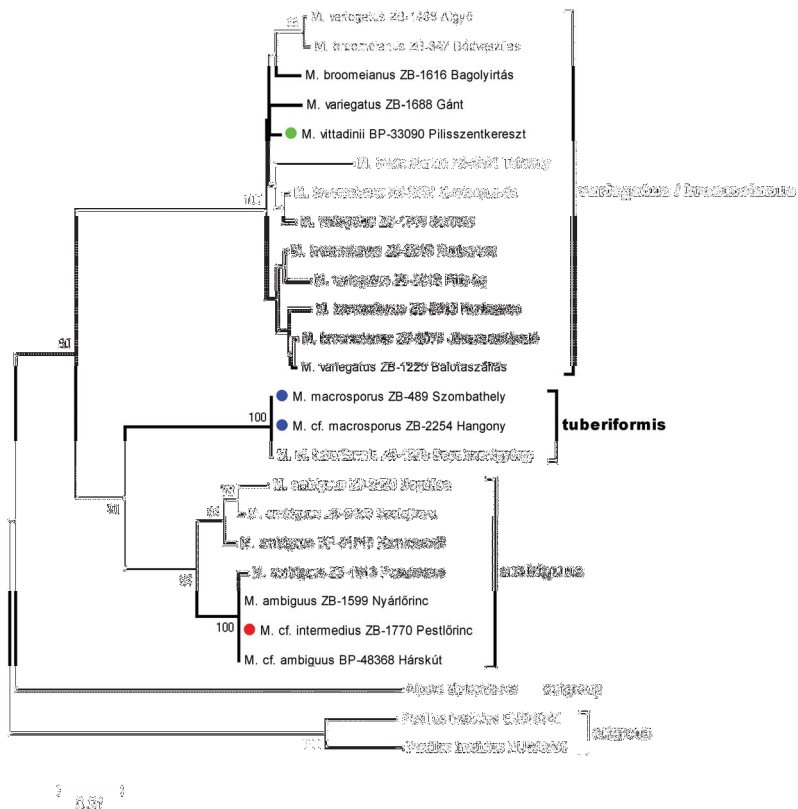


5. ábra A *Tuber* nemzetséghez tartozó 30 vizsgált minta ITS alapú, páronkénti illesztésen alapuló összehasonlító analízise. A *barcoding gap* a 84-90 % közötti értékig terjed. A *puberulum* gyűjtőfajon illetve a *rapaeodorum* fajcsoporton belüli értékek adják az átmeneti, 91-96 % közötti csúcst.

Melanogaster nemzetség

A *Melanogaster* ITS szekvenciák alapvetően 3, egymástól jól elhatárolt csoportot alkotnak (6. ábra). Az első csoportba tartozik három, nagy-tojásdad ($>10\ \mu\text{m}$) vagy csepp alakú spórával rendelkező minta (*M. tuberiformis*), maximálisan 1 nukleotid eltéréssel. Két mintára ráillik a *M. macrosporus* Vel. faj leírása, azonban a két taxon között az egyetlen eltérés a spóra szélességében van. A szekvenciák alapján a közeli rokonságot sikerült megerősíteni, sőt, a *M. macrosporus* fajnév illegitimitása is valószínűsíthető. Ahogy azt már az Irodalmi áttekintésben említettük, a szerzők egy része (pl. Lange, 1956) a nagyspórás fajok spóraméretét $15\text{--}16\ \mu\text{m}$ között állapítja meg. Az általunk mért Kárpát-medencei *M. ambiguus* anyagok jelentős részénél azonban a spórahossz mindössze $12\ \mu\text{m}$ körül szóródik, a fenti érték ritkaságszámba megy.

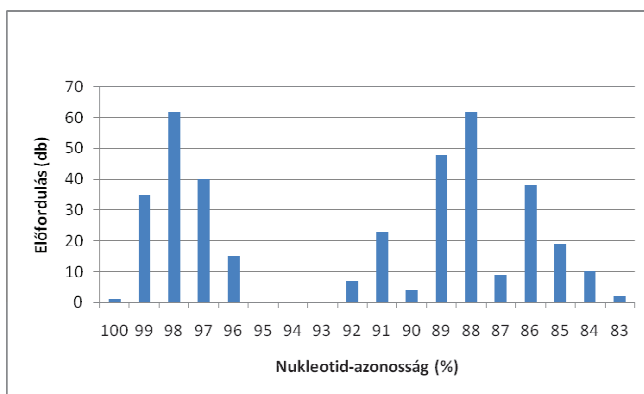
Egységes ágat képvisel a kis spórájú ($<10\ \mu\text{m}$ spórahossz) minták többsége, 0–3% közötti különbséggel a bázissorrendben. Ide tartozik a *M. vittadinii*, valamint a *M. broomeianus* és *M. variegatus*-ként határozott szekvenciák többsége. A csoport további felosztása ITS szekvencia alapján nem megoldható, az ágon belüli bootstrap-értékek is az egységességet valószínűsítik. Megjegyzendő, hogy a *M. variegatus* és *M. broomeianus* fajok közötti különbség jellemzően csak a spóra szélességében és alakjában rejlik, nevezetesen az előbbi faj tojásdad-ellipszoid alakú spórákkal rendelkezik, míg az utóbbi a leírások alapján hengeressel. A mikroszkópos vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy sok *M. broomeianus*-ként azonosított termőtestben vegyesen vannak jelen az ellipszoid és a hengeres spórák. Az alaposabb vizsgálatok kiderítették, hogy ezekben az esetekben dinnyemag alakú spóráról van szó, melyek a ráeső fény irányától függően tűnhetnek szélesebbnek vagy keskenyebbnek, így a jövőbeni határozókulcsokban szükség lenne a spórák mindhárom dimenziójának mérésére (hossz, szélesség, vastagság). A spórahossz és –szélesség hányadosait feltüntető grafikonon (12. ábra) is egységes csoportot képez a kisspórás anyagok túlnyomó többsége, bár a nagyobb szélességértékek ($>4,5\ \mu\text{m}$) nagyobb arányban tartoznak a *M. variegatus*-hoz. A szekvenálási eredményekből (6. ábra) is kitűnik, hogy a *broomeianus* és *variegatus* fajok ITS alapon nem különíthetők el.



6. ábra *Melanogaster* ITS szekvenciák alapján, szomszédcsatolási eljárással készült konszenzus törzsfa 27 taxon bevonásával. A fa szerkesztése, 1000 véletlenszerű ismétlést (bootstrap) figyelembe véve, a MEGA4 programcsomag „Neighbor-Joining” algoritmusának felhasználásával történt. A 70 %-nál nagyobb bootstrap-értékek az elágazások mellett vannak feltüntetve. Az evolúciós mátrixot a 'Maximum Composite Likelihood' opcióval számítottuk. Illesztési hézagok és hiányzó adatok kezelése: teljes törlés. A végső adatsor 589 pozíciót tartalmazott. Skála: nukleotidcserek száma pozíciónként.

- *M. macrosporus* morfológiai faj
- *M. vittadinii* morfológiai faj
- *M. intermedius* morfológiai faj

A harmadik klád felöleli az összes *ambiguus* mintát, a szekvenciabeli eltérés legfeljebb 4% az ágon belül (7. ábra). Nem szeparálódnak a fejletlen apiculus-szal rendelkező *M. intermedius*-ként meghatározott minták, így ennek a morfológiai fajnak sem lehetséges az ITS alapon való elválasztása. Az extra nagy illetve kis spóraméretű minták is hasonló nukleotidszekvenciát mutatnak. Néhány anyagnál előfordul, hogy csak egyes spórák végződnek apiculus-ban, és többségben találunk ovális vagy csepp alakúakat. Minden esetben akad azonban legalább néhány spóra, ahol felfedezhető az apiculus-ra utaló csúcsosodás, míg a méretben gyakran hasonló *M. tuberiformis* esetében ez soha sincs jelen. Jellegzetes példa erre a BP-48368 számú anyag, ahol mindössze 10-12 x 6,5-7 µm-es spórákat találunk, ami *M. tuberiformis*-ra utal, azonban a spórák kb. egytizedénél gyenge papilla vehető észre. Az ITS szekvenciák megerősítették a *M. ambiguus* fajhoz való tartozást, holott Y. Wang 1985-ben végzett mikroszkopos vizsgálatai szerint is *M. tuberiformis*-ről volt szó.



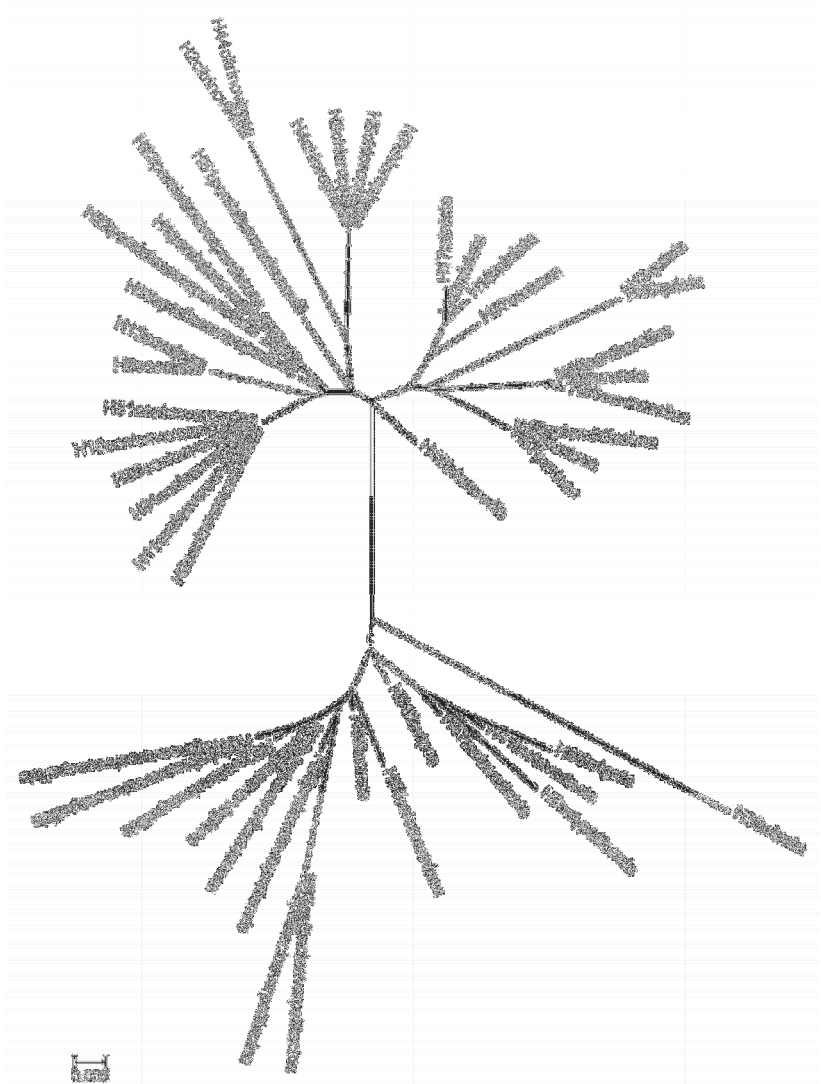
7. ábra A *Melanogaster* nemzetséghez tartozó 23 vizsgált minta ITS alapú, páronkénti illesztéssel alapuló összehasonlító analízise. A *barcoding gap* a 93-95 % közötti értékig terjed.

Hygrocybe nemzetség

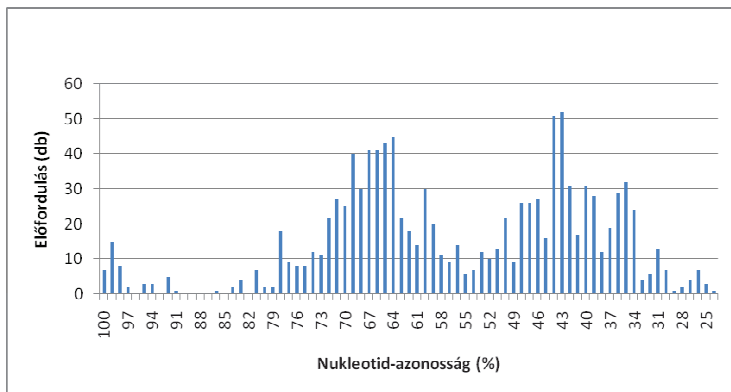
A *Hygrocybe* nemzetség összefoglaló törzsfáján (8. ábra) első látásra feltűnik a számos ág. A genetikai távolság egyes taxonok között rendkívül nagy, ugyanazon genus tagjai között egészen szokatlan: akadnak fajok, melyek ITS régiójának nukleotidjai között mindössze 24-25 % a homológia (11. ábra). Az elágazások közül mindössze néhányhoz rendelhető magas bootstrap-érték (>60%), és ezek általában a nagyobb csoportokat jelzik. A morfológiai szekciók és fajcsoportok topológiája a különböző számítási modellekben valamelyest eltér, ám mindegyik megegyezik abban, hogy a tágan értelmezett *Hygrocybe* nemzetség két, egymástól élesen elváló ágra oszlik. Az "A" és "B" ág 90 % körüli bootstrap-értékkel válik szét, a legmagasabb homoplázia-érték a két ág bármely két tagja között mindössze 42 %.

Előbbi elválás jellemző színeikben is tükröződik: a "B" ág minden taxonja rikító sárga, narancs illetve piros színekkel jellemezhető, míg az "A" ág képviselőinél a halvány, kevésbé élénk árnyalatok, fehér, szürke, barna, néhány esetben olív és rózsaszín színek fordulnak elő.

Az alnemzetségeket illetve szekciókat tekintve ez azt jelenti, hogy az "A" ág öleli fel a *Cuphophyllus* alnemzetséget, továbbá a *laeta*, *psittacina*, *nitrate*, *irrigata* és *calyptriformis* fajokat, vagyis a *Neohygrocybe* és *Glutinosae* szekciókat, valamint a *H. calyptriformis* fajt. A "B" ág pedig a *Coccineae* szekciót és a *H. calyptriformis* nélküli *Hygrocybe* alnemzetséget foglalja magába.



8. ábra *Hygrocybe* ITS szekvenciák alapján, szomszédcsatolási eljárással készült konszenzus radiális fa 48 taxon bevonásával. A fa szerkesztése, 1000 véletlenszerű ismétlést (bootstrap) figyelembe véve, a MEGA4 programcsomag „Neighbor-Joining” algoritmusának felhasználásával történt. Az evolúciós mátrixot a 'Maximum Composite Likelihood' opcióval számítottuk. Illesztési hézagok és hiányzó adatok kezelése: teljes törlés. A végső adatsor 194 pozíciót tartalmazott. Skála: nukleotidcserék száma pozícióként.



11. ábra A *Hygrocybe* nemzetséghez tartozó 48 vizsgált minta ITS alapú, páronkénti illesztésen alapuló összehasonlító analízise. A *barcoding gap* a 87-96 % közötti értékig terjed. A 91-95 % között megjelenő csúcsokat az egy fajhoz tartozó változatok adják.

A diszkusszióban sorra vesszük a hagyományos rendszertani csoportok szerinti észrevételeket, mivel a törzsfán (9-10. ábra) nem jelentkeznek szekció méretű csoportosulások. Ehhez a Boertmann (1995) és Candusso (1997) által használt rendszertani kategóriákat alkalmazzuk. Vannak szabad szemmel is biztosan meghatározható *Hygrocybe* taxonok (pl. *H. ovina*, *H. calyptriformis*, *H. spadicea*, *H. citrinovirens*, *H. intermedia*, *H. irrigata*, *H. laeta*, *H. pratensis*, *H. conicoides*, *H. conica*). A fajok többségénél általában csak a mikroszkópos vizsgálat és a makrobélyegek egyidejű figyelembevétele segít a taxont megközelítően pontosan meghatározni (pl. *H. marchii*, *H. coccinea*, *H. reidii*, *H. constrictospora*, *H. phaeococcinea* és *H. aurantiosplendens* taxonok szétválasztásánál; a *H. punicea* és a *H. splendidissima* meghatározásánál; a *H. glutinipes*, *H. vitellina* és a *H. laeta* var. *flava* megkülönböztetésénél; a *H. helobia* és a *H. miniata* szétválasztásánál vagy pl. a *H. ceracea*, a *H. insipida*, *H. constrictospora* és a *H. mucronella* fajok megkülönböztetésénél). Különösen a legutóbbi nagy csoport taxonjainál nem tekinthetők a mikrobélyegek önmagukban eléggé szignifikáns különbségeknek. Boertmann szerint ráadásul a *H. ceracea*, *H. insipida* és a *H. constrictospora* kiszáradt termőtesteit már nem lehetséges mikroszkópus bélyegeik alapján, utólag egymástól megkülönböztetni, csak abban az esetben, ha a friss termőtestek bizonyos jellemzőit a termőhelyen rögzítették vagy feljegyezték. Ugyanekkor sok taxon van, melyek makro- és/vagy mikroszkópos bélyegeit évtizedek óta sikerrel használták a határozásnál, és csak nemrég, elsősorban Boertmann morfológiai vizsgálatainak köszönhetően kérdőjeleződtek meg, mint különálló fajok, illetve taxonok (Boertmann, 1995).

Diszkusszió

Elsődleges feladatunk tehát a morfológiai vizsgálatokból és a filogenetikai analízisekből nyert információk összevetése volt, hogy igazoljuk vagy cáfoljuk a bevett fajhatározási módszereket. Amennyiben eltérő eredményre jutottunk a kétféle úton, bővebben fejthetjük ki az általunk elfogadhatónak vélt magyarázatot. A *Tuber* nemzetség vizsgálatakor kiderült, hogy nem minden eddig jelzett bélyeg korrelál a genetikai fajhatárokkal, viszont más tulajdonságok kiállták a próbát. A *Melanogaster* nemzetség jelen dolgozatban szereplő első hazai vizsgálata világosan kimutatta a fajhatárokat, és számos kétes faj megszüntetésére ad alapot. A fajgazdag *Hygrocybe* nemzetség viszonylag kis mintaszámú elemzése a nagyobb csoportok létjogosultságát erősíti vagy kérdőjelezi meg.

Tuber – ITS alapú analízis eredményeinek megvitatása

Az ITS alapú *Tuber*-törzsfaszerkesztés előkészítésénél azért esett választásunk a *T. excavatum*-ra külcsoportként, mivel releváns morfológiai különbségekkel rendelkezik a „kis fehér” *Tuber* fajokkal szemben. A hálózatos spórájú és világos perídiumú fajoktól elkülöníti a jellegzetes alapi üreg, a szemcsés felszínű perídium, a központi üreg felől radiálisan kiinduló trémaerek, valamint a megnyúlt nyelű és villás alapú aszkuszok. A molekuláris eredmények megerősítik a külcsoport választásának helyességét.

Az azonosítatlan *Tuber* faj helye a filogenetikai fákon eltér a maximális parszimónia illetve a neighbour-joining módszert alkalmazva. Ez az ág valamennyi alkalmazott módszerrel magas bootstrap értékkel (77-99%) csatlakozik a filogenetikai fákhoz, az outgroup-hoz kis távolságra. Ennek a *Tuber* fajnak az ITS szekvenciája az eredmények szerint igen hosszú delécióval rendelkezik az ITS-1 régió belül, a *T. puberulum*-éval megegyező pozícióban, de annál jóval több nukleotidra kiterjedően. Ez igazolja azt a megállapítást, miszerint ez a *Tuber* faj és a *T. puberulum* csoport együttes ágat alkot az „A” gap-kezelést tekintve, mindkét filogenetikai módszerrel. Amennyiben ezt a nagyméretű deléciót egyetlen mutációnak tekintjük, a maximális parszimónia illetve a neighbour-joining módszer a törzsfán ugyan eltérő pozicionálást eredményez, de mindkét esetben a külcsoport közelében figyelhetjük meg az ág csatlakozását. A morfológiai vizsgálatok is több hasonlóságot mutattak ki a *T. puberulum* és az azonosítatlan *Tuber* faj között. Perídiumuk szerkezete igen hasonló, mindkét esetben pszeudoparenchimatikus elemeket és sűrű szőrözöttséget tapasztalunk. A perídium belső rétegét is lazán egymásba fonódó hifák képezik az említett két

fajnál. A legfontosabb különbségek az utóbbi taxon szokatlanul megnyúlt spórái (hosszúság/szélesség arány: 1,5-1,8) és a spórák viszonylag kis térfogata, amely mindössze fele a *T. puberulum*-nál számítottak. Az eddig azonosítatlan faj ITS szekvenciája megegyezik egy Németországban izolált ektomikorrhizából származó ITS szekvenciával (INSD Acc. number: AJ510273) illetve több, *T. scruposum*-ként meghatározott termőtestből származóval. Megjegyzendő, hogy a *T. scruposum*, mint lehetséges megoldás korábban bennünk is felmerült, azonban a perídium szerkezetében és színében jelentkező következetes eltérések miatt nem tudtunk megalapozottan dönteni.

A három *T. borchii* szekvencia jól definiált ágat alkot, 99-100% bootstrap-értékkel. Ebben a fajban ugyan nem figyelhető meg az előzőekben tárgyalt nagyméretű delécio, a *T. puberulum* csoporttal mégis közeli rokon társaságról van szó. A két faj együttesen monofiletikus csoportot képez, mely ugyancsak magas, 99-100%-os bootstrap-értékekkel van alátámasztva. Legfőbb különbség a két taxon között, hogy a *T. borchii* belső peridiális rétege nem lazán, hanem szorosan egymásba fonódó, a felszínnel párhuzamosan futó hifákból áll. Mindkét taxon aszkospórái gömbölydedek. A *T. borchii* aszkuszkok gyakran üresek voltak, nem tartalmaztak spórákat, de nem a juvenilitás miatt, hiszen az éretlen spórák nem voltak gyakoriak egyetlen minta esetében sem. Igen jelentős a szekvenciabeli hasonlóság a *T. oligospermum* fajjal, mely elterjedési területe Dél-Európa és Észak-Afrika, azonban spórái mindig tökéletes gömb alakot mutatnak, ellentétben saját, enyhén ellipszoid spórák anyagainkkal.

A kilenc *T. puberulum* mintából hat az utolsó nukleotidig megegyezett egymással, annak ellenére, hogy eltérő élőhelyekről, jelentős földrajzi távolságról származtak. A fennmaradó három minta 2-42 nukleotidban tért el ezektől, beleszámítva a gap-eket. Ez a faj, vagy inkább gyűjtőfaj szintén jól elkülönülő ágat alkot (bootstrap-érték: 99-100%). Az előbb említett, viszonylag magas szekvenciabeli eltérés ellenére a morfológiai vizsgálatok nem mutattak ki eltérést a minták között sem perídiumszerkezetben, se spóramorfológiában. Minden idetartozó anyag szélesen ellipszoid spórával (hosszúság/szélesség arány 1-spórák aszkuszkokban 1,18-1,35) és többségében 1-3 spórák aszkuszkokkal rendelkezik, ez jellemzi a *T. puberulum* és *T. borchii* közös ágát is.

A *T. foetidum* ITS szekvenciák nem mutatnak polimorfizmust. A két minta magas bootstrap-értékkel (99-100%) válik el a közös *T. maculatum* – *T. rapaeodorum* csoporttól. Az INSD adatbázisban szereplő egyik észtországi ektomikorrhiza (Acc. number: AJ534706) ITS régiója megegyezik a mi *T. foetidum*-unkéval.

A *T. maculatum* adatok minimális polimorfizmust mutatnak, és az őket magába foglaló monofiletikus csoport is 99-100% bootstrap támogatással rendelkezik. Ezt a fajt földrajzi elterjedése is élesen elhatárolja a *T. rapaeodorum*-tól: minden vizsgált *T. maculatum* minta a Tisza és mellékfolyóinak vízgyűjtőjéről került elő, alacsonyan fekvő, síkvidéki területekről. Ehhez képest a *T. rapaeodorum* termőtestek élőhelyeinek sokfélesége egészen meglepő: az alföldi régióktól a középhegységekig egyformán előkerültek. Az egyetlen megbízható morfológiai különbség a két faj között a peridium külső rétegének szerkezetében van, ez a *T. maculatum*-nál ugyanis alapvetően prozenchimatikus, kerek vagy szögletes, vastag falú elemek kis csoportjaival, melyek átmérője nem haladja meg a 10 μm -t, míg a *T. rapaeodorum* esetében a külső réteg tömör pszeudoparenchima, 6-30 μm átmérőt is elérő sejtekkel. Továbbá, a *T. maculatum*-on nem találunk dermatocisztidákat, melyek a *T. rapaeodorum* néhány példányán azért jelen vannak, ha nem is nagy számban. Mindkét faj belső peridiális rétege meglehetősen vastag, valamint szorosan összefonódó, 4-5 μm széles hifákból áll, ezen kívül ellipszoid vagy megnyúlt spórákkal rendelkezik. Az uralkodó spóraszám aszkuszonként 2-3 illetve 3-4, ami átfed, ezért nem tekinthető biztosan elkülönítő morfológiai jellemzőnek. A ZB-2139 minta morfológiai tulajdonságai alapján a *T. rapaeodorum* fajba sorolható be, de a filogenetikai analízis szerint elkülönül a *T. maculatum* és *T. rapaeodorum* fajoktól is, különösen a „B” gap-kezelésnél. Ez a minta további vizsgálatot igényel, akár egy kriptikus taxont is képviselhet. Ezt megerősíti az a tény, hogy az előbbi két faj összes mintája közül ennek a spórái a leginkább megnyúltak, és rajtuk a hálózat szemei is szokatlanul szélesek.

A bevezetőben említett irodalmi adatok szerint a legtöbb problémát a *T. rapaeodorum* és a *T. puberulum* megkülönböztetése okozta. Az utóbbi faj tipikus jegyei a szélesen ellipszoid vagy közel gömbölyded spórák és a nagyon vékony, szinte áttetsző peridium, fejlett dermatocisztidákkal. A *T. rapaeodorum* spórái jóval nyúlankbabbak, peridiuma pedig viszonylag vastag. Külső rétegét jól fejlett pszeudoparenchima alkotja, melyen elvéve találunk csak dermatocisztidákat. Fischer (1897) nem vizsgálta meg a *T. rapaeodorum* típusanyagokat, így vonta le azt a következtetést, hogy azok a *T. puberulum*-mal szinonimok, holott számos különbség akad. Sok szerző átvette Fischer fajkonceptióit, habár a *T. rapaeodorum* 35 évvel előbb lett leírva, részletes leíró jellemzéssel és illusztrációkkal (Tulasne és Tulasne, 1862), a *T. puberulum* első leírása viszont igen rövid, csak kivonatszerű (Berkeley és Broome, 1844). A fenti eredmények egyértelműen bizonyítják a két faj különállását.

A korábbi fajkoncepciók számos ellentmondást tartalmaztak. A dolgozat 6 *Tuber* faj morfológiai jellemzőinek vizsgálatát tartalmazza 30 kollekció esetében. Ezek közül bármelyik két faj bármelyik mintája legalább egy morfológiai bélyegben eltér egymástól. Az ITS-régiók nukleotidszekvenciái alapján is leginkább fajsztintú elválást lehetett megállapítani (5. ábra). Az ily módon elkülönített fajok magas egyezést mutatva korreláltak a morfológiai jegyek alapján meghatározott fajokkal. Továbbá, bizonyos mikro- és makromorfológiai tulajdonságok megbízhatóbbnak bizonyultak másoknál, ilyenek például a perídium szerkezete, amely rendkívül fontos szubgenerikus bélyeg a „kis fehér” *Tuber* fajoknál. Más, eddig alapvető fontosságúnak tartott jellemzők, mint az aszkuszonkénti spóraszám eloszlása, csak korlátozott taxonómiai érvényességgel használhatóak, hiszen az egyes fajoknál gyakran átfednek az értékek. Ebben a fajcsoportban az ITS-régió szeparációs hatása igen jól érvényesül, sőt, további szekvenciák elemzésével egyéb fajkoncepciók is igazolhatók. Kétséges vagy le nem írt taxon esetén mindenképpen ajánlatos az ITS-régió vizsgálata, mint ahogy az már a taxonómiában széles körben elterjedt.

Melanogaster – ITS alapú analízis eredményeinek megvitatása

Az eredményekből kitűnik, hogy 3 illetve 4 faj honos a Kárpát-medencében (*M. ambiguus*, *M. broomeianus*, *M. tuberiformis*, *M. variegatus*). Ezek közül a kisspórás fajok morfológiai elválasztása két bélyeg (spóra alakja és hosszúság/szélesség hányadosa) alapján kevés átfedéssel biztonsággal megoldható (12. ábra), azonban az ITS szekvenciaanalízis során nem határolható el egymástól a két csoport.

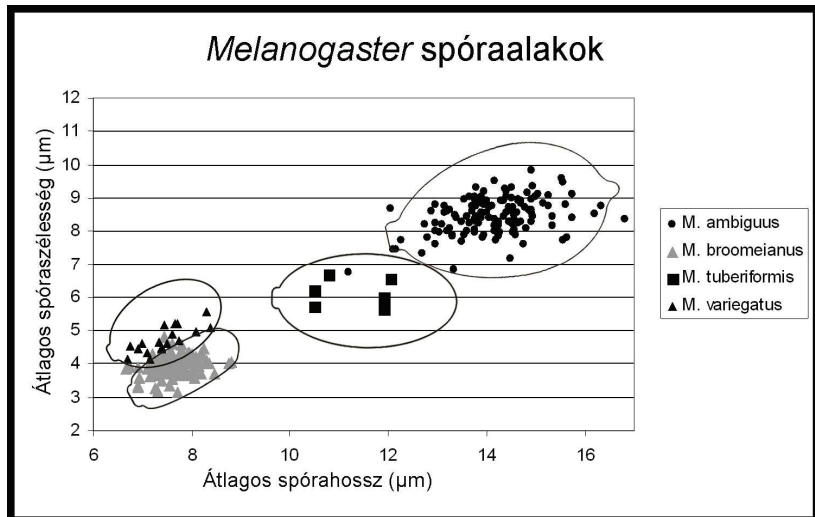
Vizsgáltunk néhány torz spórájú és éretlen anyagot is, ezeket egytől egyig a fenti 4 faj valamelyikébe soroltuk. Ide tartozik a *M. hollosii* holotípusának számító gyűjtés (1897. június 7., Anina), melyben valóban található néhány kihegyesedő végű spóra, azonban a spórák jelentős része torzult, görbült, inkább egy parazitával fertőzött termőestről lehet szó.

A Wang, Castellano és Trappe által írt kiadatlan kéziratban a BP-23638 számú anyag *M. pseudobroomeianus* néven van nyilvántartva, gyűjtési helyként ’Olaszország’ megjelöléssel, pedig Magyarországon, Szigetszentmiklóson gyűjtötte Moesz G. Mikroszkópos vizsgálataink szerint a minta spórái teljesen éretlenek, vékony falúak, világos árnyalatúak, így egy újonnan létrehozott faj alátámasztására nem lehet alkalmas. Egyébként egy másik magyarországi gyűjtést szintén olaszországinak jelez a kézirat, a BP-28634 számú solymári anyagot tünteti fel Lombardiából származónak.

Habár a Wang által végzett herbáriumi revízió nem mutatta ki a *M. variegatus* jelenlétét a Kárpát-medence területén, az azóta előkerült kollekciók közül több mint tízre bizonyossággal illik a *M. variegatus* (Vitt.) Tul. fajleírás.

Szükségesnek láttuk a nagyszámú spóramérés után, saját tapasztalatainkra alapozva létrehozni a Kárpát-medencei *Melanogaster* anyagok dichotomikus határozókulcsát, mely a következőképpen alakul:

- 1.a) Spórák hossza általában 10 μm alatt ----- 2.
- 1.b) Spórák hossza általában 10 μm felett ----- 3.
- 2.a) Spórák alakja megnyúlt vagy zömök hengeres, keskeny tojásdad, néha szélesen tojásdad. Hosszúság/szélesség hányados általában 1,7 felett ----- *M. broomeianus* Berk.
- 2.b) Spórák alakja tojásdad, ellipszoid, sohasem hengeres. Hosszúság/szélesség hányados általában 1,7 alatt ----- *M. variegatus* (Vitt.) Tul.
- 3.a) Spórák többé-kevésbé kifejezett apikulusszal, vagy legalább néhány közülük enyhén kicsúcsosodik ----- *M. ambiguus* (Vitt.) Tul.
- 3.b) Spórák apikulusz nélkül, tompán lekerekítettek, sohasem citrom formájúak -----
----- *M. tuberiformis* Corda



12. ábra A Kárpát-medencei *Melanogaster* fajok morfológiai alapú elválasztása a spóra alakjának, hosszának és szélességének alapján. A két jelleg együttes figyelembevétele még a kisspórás fajok esetében is meglehetősen biztonságos elkülönítést tesz lehetővé.

A *Melanogaster* szekvenciák páronkénti összehasonlításából készített eloszlási diagram (7. ábra) klasszikus „*barcoding gap*”-et mutat 93-95 % között. Az azonos fajhoz tartozó minták tehát 96-100 %-ban fednek, beleértve a *M. broomeianus* – *M. variegatus* komplexet. A *M. vittadinii* minta sem rendelkezik ezektől eltérő ITS régióval, tehát legfeljebb változatként lehetne a jövőben tárgyalni. A *M. ambiguus*-tól a *M. intermedius* szintén nem különbözik sem spóraméretben, sem ITS szakaszban, mindössze a fejletlen csúcscsömölcs a jellegzetes vonása. Itt is a 'változat' (varietas), vagy akár a 'forma' kategória megtartása javasolt. A *M. tuberiformis* hazánkban ritka faj, a Kárpát-medencében mindössze 6 bizonyított előfordulással. Egy rövidebb és egy hosszabb spórájú típusát mutattuk ki, mely utóbira illik Montecchi és Lazzari (1993) *M. macrosporus* felfogása, azonban ITS szinten ez egyáltalán nem kimutatható. Távoli vidékek *Melanogaster* fajainak vizsgálatával valószínűleg módosul néhány fajkoncepció, azonban egyelőre monofiletikus nemzetségről van szó

Melanogaster mikorrhizaminta az INSD adatbázisban mindössze 6 darab fordul elő 2008. szeptemberéig, ami rendkívül kevés például a „kis fehér *Tuber*” vagy *Boletus* mintákhoz képest. Valószínűnek tűnik a feltételezés, miszerint a *Melanogaster* ritka nemzetség, ez egybecseng a herbáriumokban fellelhető alacsony példányszámmal is.

Hygrocybe – rendszertani kategóriák szerinti áttekintés és az ITS alapú analízis eredményeinek megvitatása

Cuphophyllus Donk alnemzetség

Cuphophyllus szekció

A *Cuphophyllus* szekciónak megfelelő ág elkülöníthető a törzsfákon (9. és 10. ábra), de a csoport az alkalmazott modelltől függően mono- vagy polifiletikus. A két alszekció kevert ágat alkot. Ez nem meglepő abból a szempontból, hogy a *Cuphophyllus* és a *Virginei* alszekció fajainak morfológiai alapon történő elkülönítése is gyakran problémákba ütközik.

Cuphophyllus alszekció

Habár az alszekció tagjai Boertmann (1995) szerint száraz kalapbőrrel és kisebb spórákkal rendelkeznek (5-6 μm), számos esetben fordul elő

tévesztés, félrehatározás, például a *H. pratensis* var. *pallida* csenevész példányai és a *H. virginea* között. A szekvenciák alapján a *H. virginea* és a *H. pratensis* csoport is polifiletikus eredetű. Tehát inkább fajcsoportról lehet beszélni a *virginea* és *pratensis* esetében. Fokozza a problémát, hogy a Tricholomataceae családba tartozó egyéb (például pereszké-) fajok ITS régióbeli hasonlósága a *H. virginea* változataival 84-85 %-os nukleotid egyezést mutat. Ez felveti azt a lehetőséget, miszerint a *Cuphophyllus* alnemzetség polifiletikus eredetű, és fajai valójában testfelépítésükben redukálódott, elszigetelt populációkban evolválódó pereszkéknek tekinthetők. Hasonló eredményre jutott Matheny és mtsai (2006) számos nagygombafaj több génre alapozott filogenetikai analízisével: több más család mellett a Tricholomataceae és a Hygrophoraceae család polifiletikus eredetét is kimutatták. Javasolják a *Gliophorus*, *Camarophyllus* és *Humidicutis* nemzetségnevek használatát is a könnyebb átláthatóság érdekében.

Virginei Bataille alszekció

Flavipes fajcsoport: *flavipes*, *lacmus*, *colemanniana*

A *H. lacmus*, *H. flavipes* és a *H. colemanniana* mikrobélyegek alapján ugyan nem produkálnak szignifikáns különbségeket, de a genetikai vizsgálatok nagy szekvenciabeli eltéréseket mutatnak közöttük (Zagyva és mtsai, 2003). Boertmann (1995) szerint továbbra is különálló fajokként kellene szerepelniük, elsősorban makrobélyegek alapján, másodsorban minimális és inkonstans spóraméretbeli különbségek miatt. Krieglsteiner (2000) szerint viszont nincsen sem a makro- sem pedig a mikrobélyegek terén szignifikáns és megbízhatóan határozható különbség, vagy rés (hiátus) a három fenti taxon között. Eredményeink szerint a H48 *lacmus* és a H54 *flavipes* alkot szorosabb csoportot (bootstrap érték 85 %), amit jellemezhet a termőtestjeiken megjelenő kék szín.

Virginei fajcsoport: *virginea*, *fuscescens*, *ochraceopallida*

A filogramon (10. ábra) a *Cuphophyllus*-okat tömörítő ág meglehetősen egységes, ám alacsony bootstrap értékkel ugyan, de szétválik a *pratensis* és *virginea* csoport. A H26 *pratensis* valamivel nagyobb

hasonlóságot mutat a DQ486685 *canescens*-hez és a DQ486683 *pratensis*-hez, mint a *virginea* csoporthoz. Érdekes, hogy csak ennek a mintának van kisméretű spórája a vizsgált anyagok közül, míg ha a kalapbőrt tekintjük, ellentmondásba ütközünk: a H20, H21, H24 kalapbőre száraz cutis (*pratensis* jelleg), a H19 és H26 mintáké pedig ixocutis (*virginea* jelleg). A fán ezek szerint a spóraméter szerinti elválás valósul meg. Az ehhez az alakkörhöz tartozó szekvenciák között mindössze néhány százalék az eltérés és jól elkülöníthető kládot alkotnak. Boertmann (1991) feltétlenül szükségesnek tartja a *H. virginea* csoport (*H. russocoriacea*, *H. virginea*, *H. fuscescens*, *H. ochraceopallida*, *H. colemanniana*) mielőbbi rendszertani revízióját. Candusso (2002) három szekciót különböztet meg a tárgyalt alnemzetségen belül: ezek közül a *Virginei* (Bat.) Singer szekció tartalmazza a *H. virginea*-t és változatait: a *H. canescens*-t és a *H. berkeleyi*-t, a *Cuphophyllus* Donk szekció pedig többek között a *H. pratensis*-t és a *Flavipes* fajcsoportot.

Pseudohygrocybe Bon alnemzetség

***Neohygrocybe* Herink** szekció

Ebből a szekcióból egyetlen mintát volt lehetőségünk vizsgálni. A *H. nitrata*, sajátosan rövid ITS régiója folytán igen jelentős különbséget mutat minden más taxontól, azonban ezen az alapon való csoportba soroláshoz további információk szükségesek. A *Neohygrocybe* szekció Bresinsky és Kronawitter (1986) cikkében is tökéletesen lefedi az általuk 3.0 elnevezésű csoportot, amelybe muszkafavin nélküli fajok tartoznak. A mi eredményeink szerint is az "A" ágon kap helyet ez a faj.

***Glutinosae* Kühner** szekció

Mindhárom vizsgált faj (*H. laeta*, *H. irrigata* és *H. psittacina*) magas bootstrap-értékkel alkot külön csoportot, a fajok közötti nukleotid azonosság viszont relatíve alacsony. Ez korrelál azzal a ténnyel, hogy a szekció fajainak morfológiai úton történő elválasztása megbízható, jól határozható fajokról van tehát szó. A fajok közös bélyege a termőtest ragacsossága és a basidiumok medaillon-szerű csatja.

***Psittacina* fajcsoport:** *H. psittacina*, *H. laeta*

Mindkét taxonnál megjelenik a tönk csúcsán a zöld szín, a *psittacina* esetében ez zöld, sárgászöld, a *laeta* tönkjének csúcsa pedig esetenként oliv vagy zöld színárnyalatú lehet (Candusso, 1997; Beisenherz, 2002). Beisenherz (2002) szerint a *H. laeta* vörös színanyaga lefedi a kék és zöld színanyagokat. Bresinsky és Kronawitter (1986) kimutatta, hogy sem a *H. psittacina*, sem a *H. laeta*, sem pedig a közeli rokon fajnak vélt *H. sciophana* nem rendelkezik muszkaflavin pigmenttel. A mi eredményeink, ezzel összhangban a muszkaflavin-mentes "A" ágba helyezik a vizsgált fajokat. A szekción belül csak a *H. laeta*-nak vannak lefutó lemezei és ixocheilocystidái, valamint halvány rózsaszín szárítmánya, a többinek a lemezei felkanyarodók, és szárítva élénk narancsszínűvé válnak. Habár a H41 és H47 *H. laeta* élőhelyei egymástól több száz km-re esnek, ITS régiójukban mégis minimális az eltérés. A H41-es minta, amely az alapfajtól néhány morfológiai bélyegben eltérő *H. laeta* f. *pseudopsittacina*, azzal gyakorlatilag megegyező ITS régióval rendelkezik.

***Coccineae* Fayod szekció**

A *Coccineae* szekció polifiletikusnak bizonyult a molekuláris adatok alapján. A korábban elfogadott három alszekciót (*Squamulosae*, *Siccae* és *Coccineae*) eredményeink nem igazolják.

***Coccineae* (Bat.) Singer alszekció**

Az alszekció szétagolt, polifiletikus, képviselőik szeparált ágakon találhatók. A *H. coccinea* minták a rendszertani fán távol képeznek egységes csoportot, maximális bootstrap-értékkel. *H. punicea*, *H. splendidissima* teljesen azonosnak mutatkozik genetikailag, Krieglsteiner (2002) feltételezésének megfelelően, aki a *H. splendidissima*-t a *H. punicea* változatának tekinti. A *H. ceracea* elkülönült csoportot alkot, bár magasabb ITS homológiát mutat a *H. miniata* fajjal, mint másokkal.

***Siccae* Boertm. alszekció**

Ez az alszekció is polifiletikusnak adódott. Bár csak 2 taxont vizsgáltunk (*H. splendidissima* és *H. quieta*), közeli rokonságot nem mutattunk ki. A két *H. quieta* minta 80 %-os bootstrap-értékkel válik le, egy csoportban a lefutó lemezű narancsvörös *Hygrocybe* fajokkal. A

H49 *splendissima* viszont a H29 és H57 *puniceá*-val azonos genetikailag.

***Squamulosae* (Bat.) Singer** alszekció

Eredményeink szerint a mélyen lefutó lemezű, pikkelyes kalapú *Lepida* fajcsoport élesen elkülönül a felkanyarodó trámájú *Miniata* fajcsoporttól. Két kritikus alakkört tárgyalunk:

***Lepida* fajcsoport:** *cantharellus*, *coccineocrenata*, *turunda*.

A H16 és H38 *cantharellus* és a H58 *turunda* jól elszigetelt csoportot alkotnak. A közös bélyeg ennél az alakkörnél a lefutó lemezállás. Makroszkóposan vizsgálva a *H. coccineocrenata* és *H. turunda* nagyon erősen feketén pikkelyes kalapúak, míg a *H. cantharellus* nem pikkelyesebb, mint a *H. calciphila*. A *H. cantharellus* és a *H. turunda*, amelyek állítólagosan jól megkülönböztethetők makroszkópikus bélyegeik alapján, évtizedekig biztosan meghatározható, különálló fajoknak számítottak, de mivel mikrobélyegeikben szignifikáns különbséget senki sem tudott fölmutatni, Boertmann szerint legfeljebb egy faj változatai lehetnek. Ezt igazoló molekuláris eredményt tudunk mi is felmutatni.

***Miniata* fajcsoport:** *miniata*

A *H. miniata* minták (H17, H18 és H40), szinte azonos ITS nukleotidsorrenddel egy élesen szeparált csoportba kerültek (bt=97 %).

Hygrocybe alnemzetség

A *Hygrocybe* alnemzetség közel monofiletikus csoportként különválík. Egy magas bootstrap értékkel (89 %) rendelkező ág összefogja a *Hygrocybe* és *Chlorophanae* szekciókat, kivéve a *H. intermedia* fajt.

***Microspora* Boerm.** szekció

A két *H. citrinovirens* magas bootstrap-értékkel (bt=100 %) elszigetelt csoportot alkot. A szekció másik faja, a *H. calyptriformis* helye talán a legváratlanabb eredmény: az "A" ághoz tartozik, a *Glutinosae* szekció fajaival egyetemben, azonban ezen belül egymaga alkot elkülönült csoportot. Bresinsky és Kronawitter (1986) szerint ez a faj tartalmaz muszkaflavint, ám az ő csoportosításuk szerint egy teljesen különálló csoport egyetlen tagjaként jelölük meg. A cikk további részében nem említik a fajt, tehát részleteket nem tudunk

meg a tartalmazott muszkaflavin pigmentekről, sem azt, hogy miért találják egyedinek ezt a csoportot.

Mind a négy *H. chlorophana* minta nukleotidsorrendje azonos, és egy jól elkülönülő ágat képeznek (bt=100 %). A H7 minta a makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatok szerint is az alapfaj egy változatának, *H. chlorophana* var. *aurantiaca*-nak azonosítható. Vizsgálataink szerint genetikailag nem különbözik az alapfajtól.

***Hygrocybe* szekció**

***Nigrescentes* (Bat.) Arnolds alszekció**

***Conica* Bon** fajcsoport: *H. conica* var. *conica*, *H. conica* var. *conicoides*

A *H. conica* var. *conica* és a *H. conica* var. *conicoides* 3-3 mintája egy kivétellel teljesen azonos ITS régióval rendelkezik. A Bon szerinti “feketedő” csoport taxonjai közül (*H. conica*, *H. conicoides*, *H. riparia*, *H. veselskyi*, *H. tristis*, *H. olivaceonigra*), a *H. olivaceonigra*-t leszámítva Boertmann (1995) csak a *H. conica*-t ismeri el önálló fajnak, elsősorban spórajellegzetessége alapján, a többi szerinte legfeljebb a *H. conica* különböző formája, vagy szinonímjai lehetnek. A kissé különböző H34 *H. conica* var. *conica* Bon szerint határozva *H. tristis*-nek felel meg. Bresinsky és Kronawitter (1986) a *Conica* fajcsoport egyébként csak színben és méretben eltérő tagjai között a pigmentösszetételben különbségeket mutattak ki. Mindőjük tartalmaz muszkaflavint, azonban az egyes aminosavakkal képzett konjugátumok tekintetében jelentős mennyiségi és minőségi eltérésekre derítettek fényt az említett kutatók. Ezek a taxonok gyakran egy helyen, egy időben teremnek a rokon taxonokkal, és noha egyes termőtestek rendelkezhetnek más-más domináló pigmentekkel, kísérleteink eredménye szerint nem tekinthetjük őket genetikailag eltérő vonalaknak. Így a külön fajok vagy változatok helyett legfeljebb a ‘forma’ megjelölés lenne helyénvaló.

H. persistens, *H. acutoconica*, *H. konradii*, *H. subglobispora*, *H. aurantiolutescens*:

Vizsgálataink szerint a három *H. persistens* minta egy zárt monofiletikus csoportot képez (bt=93 %), míg a *H. spadicea* és a *H. konradii* külön taxonnak bizonyul. Arnolds (1980), Bon (1992) és Moser (1983) a *H. persistens*-t gyűjtőfajnak tartja, legalább két fajsztintú taxonnal, valamint több változattal és formával. Boertmann (1995) szerint az első két taxon csak szinoníma lehet, míg a *H. konradii* a *H. persistens* változata. A *H. konradii* ettől függetlenül biztosan elkülöníthető a *H. persistens* var. *persistens*-től. Mikrobélyegek tekintetében is élesen elválík tőle zömök spórája révén.

Eredményeink tükrében javasoljuk a *H. laeta*, *H. psittacina*, *H. nitrata*, *H. irrigata*, *H. calyptriformis* fajok és a *Cuphophyllus* alnemzetség tagjainak kizárását a *Hygrocybe* nemzetségből. Az előbbi négy fajt a *Gliophorus* nemzetségnév érvényesítésével tárgyalhatnák a későbbiekben, a *H. calyptriformis* faj szűkebb rokonságának felderítése érdekében további minták vizsgálata szükséges. Az Európán kívüli taxonok felderítése hozhatja meg az igazi megoldást. Boertmann szóbeli közlése szerint a *H. calyptriformis* több mikroszkópos tulajdonsága megegyezik a *Humidicutis* trópusi nemzetség fajaival, ahol egyébként számos rózsaszínű termőtestet találunk. A limitált számú vizsgált minta miatt itt egyelőre még nem adhatunk választ számos kérdésre, például az *Oreocybe* szekció helyzetére sem.

A gombataxonómia napjainkban ismét aranykorát éli. Becslések szerint a Földön élő gombafajok száma valahol 1,5 millió és 13,5 millió közé tehető, és ebből a 100 ezret sem éri el az érvényes leírással rendelkező fajoké az All Fungi Barcoding honlap tanúsága szerint. Az érvényben lévő osztályozási rendszerek drasztikusan változnak, alkalmazkodva az új molekuláris eredményekhez. Az új rendszertan a bizonyítottan monofiletikus csoportokra épül, ehhez a szükséges adatok gyűjtését jelenleg is számos intézmény bevonásával végzik (Hibbett és mtsai, 2007) az AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life) program keretében. Hebert és mtsai (2003) vetették fel az élőlények „vonalkódolási” (barcoding) lehetőségét, vagyis lehetőség szerint az összes fajnak egyetlen kiválasztott homológ génszekvencián keresztül történő azonosítását. Állatoknál erre a célra a citokróm-c –oxidáz 1 enzim 648 nt nagyságú alegységét (CO1) jelölték ki, gombáknál azonban ez általánosságban nem vezetett a kellő eredményre, bár bizonyos gombacsoportokra kiválóan alkalmazható (Min és Hickey,

2007). Ugyanők mutatták ki, hogy a felhasznált szekvencia hossza korrelál a törzsfaj részletességével, vagyis a rövid szakaszok is használhatóak fajok elkülönítésére, azonban a magasabb szinten elhelyezkedő elágazások feltérképezéséhez már nem elegendőek. Az 'All Fungi Barcode Initiative' elnevezésű, 2007-ben megrendezett ülésen – ezzel közel egy évtizeddel korábban megkezdett ITS alapú kísérleteink fontosságát is igazolva – a résztvevők döntöttek a gombákra alkalmazandó vonalkód régió kérdésében: az ITS tölti be ezentúl ezt a funkciót, emellett a nucLSU 5'-vége és a CO1 is szerephez jut. Az INSD által tárolt gomba ITS szekvenciák száma mára a 70 ezret is meghaladja.

Ezzel párhuzamosan, nem szabad megfeledkezni a morfológiai bélyegek használatáról sem (Agerer, 1999), hiszen a hosszú időn keresztül összegyűlt tapasztalat és az újonnan elért vívmányok együtt jelentik a szakma sikerének és kiteljesedésének receptjét.

Összefoglalás

Kutatómunkánk során megvizsgáltuk három, eltérő élőhelyspektrumhoz adaptálódott gombacsoport mikromorfológiai jellemzőit, és lehetőség szerint fajhatárokat jelöltünk meg molekuláris taxonómiai módszerrel, az ITS régiók összehasonlítása alapján. A kiválasztott gombacsoportok az alábbiak voltak:

Tuber Az egyik leggyakoribbnak tartott mikorrhizás gombanemzetség morfológiaiailag hasonló karakterű, a Kárpát-medencében is honos fajainak morfológiai bélyegekre, illetve az ITS szekvenciákra alapuló filogenetikai adatokra épülő rokonsági szálainak felderítése volt a célunk. A Kárpát-medencei minták felhasználásával 6 fajt mutattunk ki, melyek közül a *T. rapaeodorum*, a *T. maculatum* és a *T. foetidum* közeli rokon, amit a hasonló karakterű peridium is bizonyít. A *T. puberulum* és a *T. aff. scruposum* szekvenciájában és peridiális szerkezetében is párhuzamot mutattunk ki, mely közelebbi rokonságot bizonyít. Kimutattuk a *T. maculatum* szigetszerű előfordulását a Tisza vízgyűjtőjén. Valamennyi szekvenciánkra találtunk legfeljebb 1 %-ban eltérő szekvenciát az INSD adatbázisában, termőtestből vagy mikorrhizált gyökérvégéből izolálva. Kimutattuk a spóraalak határozásbeli relevanciáját is.

Melanogaster Ennél a mikorrhizás, ám a *Tuber*-nél ritkább nemzetségnél mikroszkópos jellemzést készítettünk valamennyi hozzáférhető Kárpát-medencei herbáriumi anyagról. A 240 minta spóraméresei alapján 3 csoportot különítettünk el, amelyek korrelálnak az eddig leírt fajokkal. Az ellentmondást okozó spóraalakkal rendelkező anyagok legfeljebb morfológiai fajnak tekinthetők, mint a *M. intermedius*, *M. macrosporus* vagy *M. vittadinii*. Kriptikus fajokat nem találtunk.

Hygrocybe A nedűgomba nemzetségen belül elfogadott alnemzetségek, szekciók és alszekciók vizsgálata alapján egészen eltérő csoportosítást kaptunk. A három alnemzetség helyett két fő csoportot különítettünk el, melyek legjellegzetesebb különbsége a muszkaflavin pigmentek jelenléte vagy hiánya. A szekciók egy részét ITS szekvencia alapon is igazolni tudtuk, az alszekciók többségét azonban nem. A kisebb fajcsoportok rokonságát viszont alátámasztottuk.

A három, környezeti stresszhatásokhoz eltérő mértékben adaptálódott gombacsoport közül tehát a széles ökológiai tűrőképességű *Tuber* csoport több, közelrokon fajra osztható, valamint elképzelhető, hogy ezeken felül kriptikus fajok is megtalálhatók a Kárpát-medence mikótájában. A szűkebb elterjedésű *Melanogaster* nemzetség mindössze három, genetikailag élesen elkülöníthető fajra szorítkozik. A speciális élőhelyekre jellemző *Hygrocybe* fajok viszont általában élesen elváló csoportokat alkotnak, rendkívül nagy, akár nemzetséghatárokon is túlnyúló genetikai eltérésekkel.

Summary

Samples of three groups of fungi living on differing habitats were examined and determined as to species as far as possible by micromorphological features and based on a specific molecular taxonomical method, namely, comparing ITS regions.

Tuber is considered one of the most frequent mycorrhizal genus in the Carpathian Basin. Our aim was to clarify the relationships among the species with morphologically similar characteristics, using morphological features and ITS sequences. Taking the *Tuber* samples of the Carpathian Basin, six species were confirmed. *T. rapaeodorum*, *T. maculatum* and *T. foetidum* are closer relatives, as the peridial structures demonstrate it. Similarities in ITS sequences and structure of peridia of *T. puberulum* and *T. aff. scruposum* confirm a closer relationship between them. Isolated occurrence of *T. maculatum* in the drainage basin of Tisza river is demonstrated. All of our sequenced ITS regions, isolated from fruitbody or mycorrhizated root tip has homologues differing less than 1 % in the INSD database. The relevance of spore shape in *Tuber* species determination has been justified.

Every single accessible exsiccata (240 samples) of the considerably rare mycorrhizal *Melanogaster* genus, derived from the Carpathian Basin were typified microscopically. The deduced three morphological groups correlate some earlier described species. Samples with contradictorial spore shapes, such as *M. intermedius*, *M. macrosporus* and *M. vittadinii* could be considered, at the most, as morphological species. No cryptic species was found.

Infrageneric groups, like subgenera, sections and subsections in *Hygrocybe* genus were examined and revised by ITS sequences. Two large groups were separated. The most characteristic feature of the separation is the presence or absence of muscaflavin pigments. Some sections could be verified on the grounds of ITS sequences, however, most of subsections can be disproved. Relationships among lower categories, aggregates were confirmed.

To summarize the results, the three examined groups of fungi have adapted variably to stressed environment. *Tuber* has a wide ecological tolerance and proved to be divided into closer species and also some putative cryptic species. In the rarer *Melanogaster* group, three well separable species has been found. The genus *Hygrocybe* living in specific habitats contains rather separated groups with surprisingly large genetic variance, which, in some cases, calls into question the validity of membership to the genus itself.

Köszönetnyilvánítás

Disszertációm elkészítésében számos mentor, munkatárs, barát és családtag közreműködött, akik önzetlen segítségükkel és szakmai tudásukkal segítettek át a nehézségeken. Mindenekelőtt köszönöm tanszékvezetőimnek, Dr. Láng Ferencnek, Dr. Szigeti Zoltánnak és Dr. Lukács Noéminek, hogy teret és lehetőséget nyújtottak a munkavégzéshez és a dolgozat megírásához.

Témavezetőimnek, Dr. Rác Ilonának és Dr. Bratek Zoltánnak lekötelezettje vagyok a fáradhatatlan ötletgyártásuk, magas színvonalú szakmai tanácsadásuk, és nem utolsósorban erőt adó emberi kapcsolatuk révén.

Köszönöm Dr. Lásztity Demeter Tanár úrnak útmutatását és biztatását, mellyel egyengette utamat.

Fogadják szívből jövő hálámat a fiatal kutatók és hallgatók, akikkel együtt dolgoztunk éveken át: Dr. Rudnóy Szabolcs, Dr. Parádi István, Berecz Bernadett, Illyés Zoltán, Szegő Dóra, Dr. Soós Vilmos, Jóri Balázs, Orczán Ákos Kund, Merényi Zsolt, és sokan mások.

Az ELTE Növényélettani Tanszék minden dolgozójának, oktatóknak, kutatóknak, asszisztenseknek köszönöm a nélkülözhetetlen segítséget és barátságot, mellyel hozzájárultak munkám sikeréhez. Külön köszönöm Tóth Attiláné odaadó segítségét.

A BCE Növényélettani Tanszék minden dolgozójának köszönöm türelmét és biztatását, amivel mindig kitartásra ösztönöztek.

A publikációkban nyújtott, időt és energiát nem sajnáló segítségét, valamint barátságát köszönöm Dr. Zagyva Tibornak, Babos Lórántnének, Zöld-Balogh Ágnesnek.

Köszönöm azoknak a mikológusoknak és gombászoknak, akik a gombahatározásban szerepet vállaltak és rendelkezésemre bocsátották gyűjteményük darabjait: Albert László, Finy Péter, Sántha Tibor, Dr. Helmut Pidlich-Aigner, Dr. Vasas Gizella, valamint az EMSzE és a triflászok népes tábora.

Köszönöm James M. Trappe segítségét, aki szakmailag ellenőrizte a dolgozat egyes részeit, és munkájának még publikálatlan eredményeit is hozzáférhetővé tette számunkra.

Köszönöm az ELTE Mikrobiológiai Tanszék és Növénysszervezetani Tanszék egykori és jelenlegi munkatársainak a technikai problémák lebonyolításában nyújtott támogatását, kiemelve Dr. Dános Béla, Dr. Kovács M. Gábor illetve Dr. Kovács Gábor segítségét.

Mindig hálával fogok tartozni Pós Veronikának, akire mind szakmailag, mind emberileg bármikor számíthatok.

Végül köszönöm családomnak, akik sok éven keresztül szeretettel elviselték rigolyáimat, és akiknek szünni nem akaró kérdőzködésük nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozat.

Irodalomjegyzék

- Agerer R (1999): Never change a functionally successful principle: The evolution of Boletales s. l. (Hymenomycetes, Basidiomycota) as seen from below-ground features. *Sendtnera* 6: 5-91.
- Albee-Scott SR (2007): Does secotiid inertia drive the evolution of false-truffles? *Mycological Research* 111: 1032-1041.
- Alvarez IF, Parladé J, Trappe JM, Castellano MA (1993): Hypogeous mycorrhizal fungi in Spain. *Mycotaxon* 47: 201-217.
- Arnolds E (1980): De oecologie en sociologie van Wasplaten (*Hygrophorus* subgenus *Hygrocybe* sensu lato). *Natura* 77: 17-44.
- Augé RM (2004): Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* 84: 373-381.
- Babos M (1999): Higher fungi (Basidiomycotina) of the Kiskunság National Park and its environs. *The Flora of the Kiskunság National Park, Cryptogams*: 199-298.
- Bas C (1990): Tricholomataceae R. Heim ex Pouz. In: C. Bas, T. H. W. Kuyper, M. E. Noordeloos and E. C. Vellinga: *Flora Agaricina Neerlandica* 2: 65-70. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- Beisenherz M (2002): Zur Ökologie und Taxonomie der Saftlinge und Ellerlinge (*Hygrocybe*, Agaricales) *Regensburger Mycologische Schriften* Band 10: 3-65.
- Berkeley MJ, Broome CE (1844): XLII.-Notices of British Fungi. *Ann. & Mag. Nat. Hist.* I. 13: 352-360.
- Bertini L, Potenza L, Zambonelli A, Amicucci A, Stocchi V (1998): Restriction fragment length polymorphism species specific patterns in the identification of white truffles. *FEMS Microbiology Letters* 164: 397-401.
- Besl H, Dorsch R, Fischer M (1996): Zur verwandtschaftlichen Stellung der Gattung *Melanogaster* (Melanogastraceae, Basidiomycetes). *Zeitschrift für Mykologie* 62(2): 195-199.
- Binder M, Bresinsky A (2002): Derivation of a polymorphic lineage of Gasteromycetes from boletoid ancestors. *Mycologia* 94: 85-98.
- Binder M, Hibbett DS (2002): Higher-Level Phylogenetic Relationships of Homobasidiomycetes (Mushroom-Forming Fungi) Inferred from Four rDNA Regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(1): 76-90.
- Binder M, Besl H (1999): 28S rDNA sequence data and chemotaxonomical analyses on the generic concept of *Leccinum* (Boletales). Associazione Micologica Bresadola (A.M.B.), Italy. Centro Studi Micologici. *Micologia* 2000: 71-82.
- Boertmann D (1995): The genus *Hygrocybe*. In: *Fungi of Northern Europe* - Vol. 1. Greve, Denmark. pp. 184.
- Boertmann D, Rald E (1991): Notater om de danske vokshattes udbredelse, økologi og fænologi. *Svampe*, 23: 30-40.
- Bon M (1976): Clé monographique des Hygrophoraceae Roze. *Doc. Mycol.* 7 (25): 1-24.

- Bon M (1990): Flore Mycologique d'Europe 1: 35-37. Les Hygrophores. *Documents Mycologiques Mémoire Hors Série* No. 1.
- Bon M (1992) Les macromycètes des cistaies acidophiles. *Ann SSNATV* 44: 113-118.
- Bon M (1992): Die Grossspilzflora von Europa. 1. Hygrophoraceae. Übersetzt und bearbeitet von A. Einhellinger. IHW-Verlag, Eching, pp. 91.
- Bratek Z, Bagi I, Parádi I, Vikor J (2001): Differentiations among truffle species based on habitat preferences. *Actes of Vth International Congress Science and Cultivation of Truffle* 193-195.
- Bratek Z, Halász K (2005): Kiegészítések a második kiadáshoz. In: Szemere L: *Föld alatti gombavilág*. 2. kiadás, EMSzE kiadás, pp. 176-180.
- Bratek Z, Király I, Láng F (1992): R-spectra of some hypogeous mushrooms. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* 7: 95-102.
- Bratek Z, Papp L, Merkl O, Takács V (1992): Föld alatti gombákon élő rovarok. (Insects associated with underground mushrooms.) *Mikológiai Közlemények* 31 (1-2): 55-65.
- Bresinsky A, Kronawitter I (1986): Zur Kenntnis der Hygrocybenpigmente. *Zeitschrift für Mykologie* 52(2): 321-334.
- Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings KW, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR, Kretzer A, Garbelotto M, Li Y (1998): A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology* 7(3): 257-272.
- Buchholtz F (1901): Hypogaeen aus Russland. *Hedwigia* 40: 304-322.
- Buchholtz F (1907): Zweiter Nachtrag zur Verbreitung der Hypogaeen in Russland. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 4: 431-492.
- Candusso M (1997): *Hygrophorus* s.l. Fungi Europaei, 6. (Alassio, Italy) pp. 401-422., 529. and 784.
- Cantrell SA, Lodge DJ (2000): *Hygrophoraceae* of the Greater Antilles: *Hygrocybe* subgenus *Hygrocybe*. *Mycological Research* 104: 873-878.
- Castellano MA, Trappe JM, Maser Z, Maser C (1989): Key to spores of the genera of hypogeous fungi of north temperate forests with special reference to animal mycophagy. Mad River Press, Eureka, CA. pp. 186.
- Ceruti A, Fontana A, Nosenzo A (2003): Le Specie Europee del Genere *Tuber* – Una Revisione Storica. Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino. pp. 467.
- Chiu SW, Moore D, Chang ST (1989): Basidiome polymorphism in *Volvariella bombycina*. *Mycological Research* 92: 69-77.
- Comandini O, Contu M, Rinaldi AC (2006): An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16: 381-395.
- Corda AKJ (1831): Die Pilze Deutschlands In: Sturm J (eds.): *Deutschlands Flora*, 3. Abteilung. 3(11): 1-32.
- Dodge CW (1931): *Alpova*, a new genus of Rhizopogonaceae, with further notes on *Leucogaster* and *Arcangeliiella*. *Ann Mo Bot Gard* 18: 457-463.
- Donk, M.A. (1962): The generic names proposed for Agaricaceae. - *Beih. Nova Hedwigia* 5: 1-320.

- Eck RV, Dayhoff MO (1966): Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
- Felsenstein J (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein J (1995): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. University of Washington
- Fischer E (1897): Ascomyceten: Tuberaceen und Hemiasceen. In Rabenhorst, L., *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1: 1-131.
- Fischer E (1933): Gastromyceteae. In: Engler A & Harms H (eds.): *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, Bd 7a. Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Fries EM (1821): *Systema mycologicum* 1. pp. 520. Lund, Greifswald
- Fries EM (1838): *Epicrisis Systematis Mycologi, seu Synopsis Hymenomycetum*. Typographia Academica, Uppsala.
- Frøslev TG, Jeppesen TS, Laessøe, Kjøller R (2007): Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 217-227.
- Gardes M, Bruns TD (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW (1991): Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69: 180-190.
- Gardes M, Bruns TD (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 8: 915-921.
- Gross G (1987): Schlüssel zu den europäischen Sippen der Gattung *Tuber*. In: Derbsch H & Schmitt JA (eds.): *Atlas der Pilze des Saarlandes* Teil 2, pp. 79-100. Verlag der Derlattia, Saarbrücken, Germany
- Halász K, Bratek Z, Szegő D, Rudnóy Sz, Rácz I, Lásztity D, Trappe JM (2005): Tests of species concepts of the small, white, European group of *Tuber* spp. based on morphology and rDNA ITS sequences with special reference to *Tuber rapaeodorum*. *Mycological Progress* 4 (4): 281-290.
- Hawker LE (1954): British Hypogeous Fungi. *Phil Trans Royal Soc London* 650: 473-499.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 313-321.
- Henrion B, Le Tacon F, Martin F (1992): Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* 122:289-298.
- Herink J (1959): Species familiae Hygrophoracearum, collem “Velká Horka” dictum prope Mnichovo Hradiště habitantes. *Acta Mus Hort Bot Bohemiae borealis* 1: 53-86.
- Hesse R (1891): Die Hypogaeen Deutschlands. Band II. Die Tuberaceen und Elaphomyceten Halle: Verlag L. Hofstetter.

- Hibbett DS (2007): After the gold rush, or before the flood? Evolutionary morphology of mushroom-forming fungi (agaricomycetes) in the early 21st century. *Mycological Research* 111: 1003-1020.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111 (5): 509-547.
- Hibbett DS, Tsuneda A, Murakami S (1994): The secotiid form of *Lentinus tigrinus*: genetics and development of a fungal morphological innovation. *American Journal of Botany* 81: 466-478.
- Hofstetter V, Miadlikowska J, Kauff F, Lutzoni F (2007): Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 412-426.
- Hollós L (1911): Magyarország földalatti gombái, szarvasgombaféléi. K. M. Természettudományi Társulat, Budapest pp. 248.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold EA, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G-H, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton J, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin D, Spatafora J, Vilgalys R (2006): Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Knapp A (1950): Die europäischen Hypogaeen-Gattungen und ihre Gattungstypen. *Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde* 28 (Suppl. 4): 153-179.
- Knapp A (1951): Die europäischen Hypogäen-Gattungen und ihre Gattungstypen. *Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde* 29 (Suppl. 7): 65-92.
- Knapp A (1954): Die europäischen Hypogäen-Gattungen und ihre Gattungstypen. II. Teil (Fortsetzung). *Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde* 32: 149-155.
- Kärén O, Hogberg N, Dahlberg A, Jonsson L, Nylund J-E (1997): Inter- and intraspecific variation in the ITS region of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136:313-325.
- Kriegelsteiner GJ (2000): *Hygrocybe lacmus* in Baden-Württemberg (Germany). *Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas*, XIII: 19-23.

- Kriegelsteiner GJ (eds.) (2001): Die Grosspilze Baden-Württembergs Band 3. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, Germany
- Kummer P (1871): Der Führer in die Pilzkunde. C. Luppe, Zerst. pp. 146.
- Kytövuori I, Niskanen T, Liimatainen K, Lindström H (2005): *Cortinarius sordidemaculatus* and two new related species, *C. anisatus* and *C. neofurvolaeus*, in Fennoscandia (Basidiomycota, Agaricales). *Karstenia* 45: 3349.
- Laessle T, Boertmann D (2008): A new lamellate *Hygrocybe* species from Ecuador. *Mycological Research* 112: 1-4.
- Lange M (1956): Danish Hypogeous Macromycetes. *Dansk Botanisk Arkiv* 16: 1-84.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentini F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007): ClustalW2 and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.
- Lehmkuhl JF, Gould L, Cazares E, Hosford D (2004): Truffle abundance and mycophagy by northern flying squirrels in eastern Washington forests. *Forest Ecol Manage* 200: 49-65.
- Lohwag H (1926): Zur Entwicklungsgeschichte und Morphologie der Gastromyceten. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 42 (2): 117-334.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung G-H, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim Y-W, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R (2004): Assembling the fungal tree of life, progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446-1480.
- Matheny PB, Curtis JM, Hoffstetter V, Aime MC, Moncalvo JM, Ge Z W, Yang ZL, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ, Bougher NL, Hughes KW, Lodge DJ, Kerrigan RW, Seidl MT, Aanen DK, DeNitis M, Daniele GM, Desjardin DE, Kropp BR, Norvell LL, Parker A, Vellinga EC, Vilgalys R, Hibbett DS (2006): Major clades of Agaricales: a multi-locus phylogenetic overview. *Mycologia* 98(6): 982-995.
- Mattirolo O (1935): Catalogo ragionato dei funghi ipogei raccolti nel Canton Ticino e nelle provincie Italiane confinanti. *Beitr Kryptogamenfl Schweiz*. 8: 1-53.
- Mello A, Garnero L, Bonfante P (1998): Specific primers for rapid typing of *Tuber borchii* mycorrhizal roots. *Acta Horticulturae* 457: 229-233.
- Mello A, Vizzini A, Longato S, Rollo F, Bonfante P, Trappe JM (2000): *Tuber borchii* versus *Tuber maculatum*: neotype studies and DNA analyses. *Mycologia* 92: 326-331.
- Merényi Zs, Pintér Zs, Orczán ÁK, Illyés Z (2008): A Kárpát-medence hypogea fajainak biogeográfiai és ökológiai kutatása számítógépes adatbázisok létrehozásával és integrálásával. *Mikológiai Közlemények Clusiana* (in press).
- Min XJ, Hickey DA (2007): Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Notes* 7(3): 365-373.
- Mitchell J, Roberts P, Moss S (1995): Sequence or structure? A short review of the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *The Mycologist* 9: 67-75.

- Montecchi A, Lazzari G (1987): Un nuovo tartufo di montagna: *Tuber regianum* n. sp. *Associazione Micologica Bresadola* 30: 3-11.
- Montecchi A, Lazzari G (1993): Atlante fotografico di funghi ipogei. Associazione Micologica Bresadola, Centro Studi Micologici - Vicenza. pp. 180-181.
- Montecchi A, Sarasini M (2000): Funghi ipogei d'Europa. Associazione Micologica Bresadola, Centro Studi Micologici - Vicenza. pp. 262-265, 304-307.
- Moser, M. (1983). Die Röhrlinge und Blätterpilze. Band IIb/2. Basidiomyceten. 2. Teil. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. pp. 83-90.
- Nei M, Kumar S (2000): Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Page RDM (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Parladé J, Pera J, Alvarez IF (1996): Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 237-245.
- Pázmány D (1991): Conspectus Fungorum Hypogaeorum Transsilvaniae. *Notulae Botanicae, Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 20-21: 23-36.
- Pegler DN, Spooner BM, Young TWK (1993): British Truffles. A Revision of British Hypogeous Fungi. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 120-129.
- Peintner U, Bougher NL, Castellano MA, Moncalvo J-M, Moser MM, Trappe JM, Vilgalys R (2001): Multiple origins of sequestrate fungi related to *Cortinarius* (Cortinariaceae). *American Journal of Botany* 88: 2168-2179.
- Reijnders AFM (2000): A morphogenetic analysis of the basic characters of the gasteromycetes and their relation to other basidiomycetes. *Mycological Research* 104(8): 900-910.
- RiOUSset L, RiOUSset G, Chevalier G, Bardet MC (2001): Truffles d'Europe et de Chine. INRA, Paris. pp. 181.
- Roux C, Sejalón-Delmas N, Martins M, Parguey-Leduc A, D'Argent R, Bécard G (1999): Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *FEMS Microbiology Letters* 164: 7-12.
- Rubini A, Paolocci F, Granetti B, Arcioni S (1998): Single step molecular characterization of morphological similar black truffle species. *FEMS Microbiology Letters* 180: 147-155.
- Saitou N, Nei M (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Simonini G (2001): Discussione di alcune raccolte di boleti della sezione *Luridi* di difficile determinazione. *Micol Veg Mediterranea* 16(1): 4-26.
- Simpson JA (2000): More on mycophagous birds. *Australasian Mycologist* 19: 49-51.
- Smith SE, Read DJ (1997): Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed. Academic Press, London.
- Svrček M (1958): VIII. řád Melanogastrales. In: Pilát, A. (eds.), Flora ČSR, Řada B, Gasteromycetes 1: pp. 527-556, 795-802.
- Szemere L (1965): Die Unterirdischen Pilze des Karpatenbeckens. Fungi Hypogaei territorii Carpato-Pannonici. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 330.

- Szemere L (1970): Föld alatti gombavilág. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 176.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tamura K, Nei M & Kumar S (2004): Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 11030-11035.
- Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sugiyama J (2004): Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 438-449.
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjeller R (2006): Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170(3): 581-96.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Trappe JM (1975): A revision of the genus *Alpova* with notes on *Rhizopogon* and the Melanogastraceae. *Beih. Nova Hedwigia* 51: 279-310.
- Trappe JM, Castellano MA (2000): New sequestrate Ascomycota and Basidiomycota covered by the Northwest Forest Plan. *Mycotaxon* 75: 153-179.
- Trappe JM, Cázares E (2000): *Tuber maculatum* around the world. *Bulletin Semestriel de la Fédération des Associations Mycologiques Méditerranéennes* n.s. 18: 107-112.
- Tulasne LR, Tulasne C (1843): Champignons hypogés de la famille des Lycoperdacees, observés dans les environs de Paris et les départements de la Vienne et d'Indre-et-Loire. *Annales des Sciences Naturelles*, sér. 2, 19: 380.
- Tulasne LR, Tulasne C (1851): Fungi Hypogaei. Histoire et monographie des champignons hypogés. Paris. pp. 222.
- Tulasne LR, Tulasne C (1862): Fungi Hypogaei. Historie et monographie des champignons hypogés. Editio altera. Paris. pp. 222.
- Urban A, Neuner-Plattner I, Krisai-Greilhuber I, Haselwandter K (2004): Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two *Tuber* species. *Mycological Research* 108 (7): 749-758.
- Velenovský J (1922): České houby 4-5. Czechoslovakia, Prague; České Botanické Společnosti. pp. 633-950.
- Vittadini C (1831): Monographia Tuberacearum. Felicis Rusconi, Milano. pp. 88.
- Wang Y, Castellano MA, Trappe JM (1987): *Melanogaster* – revised. Kézirat.
- Wang Y, Castellano MA, Trappe JM (2005): *Melanogaster utriculatus* sp. nov. from Japan. *Mycotaxon* 93(1): 315-317.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols – A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. Part 3, pp. 315-322.

- Zagyva T (2001): Mycoflora of subalpine meadows at the Őrség Landscape Protection Area. Savaria Museum, Szombathely. *Praenorica, Folia Historico – Naturalia* 4: 126-171.
- Zagyva T (2003): Die Grosspilzflora der Magerwiesen im Nationalpark Őrség–Vendvidék und Vorschläge für Erhaltung und Management. *Burgenländische Forschungen*, Landesarchiv, Eisenstadt 87: 41-49.
- Zagyva T, Halász K, Albert L, Bratek Z (2003): Taxonomische Probleme innerhalb der Gattung *Hygrocybe*. Karl – Franzens Univ. Graz, *Fritschiana* 42: 71-74.
- Zeller SM, Dodge CW (1936): *Melanogaster*. Ann. Mo. Bot. Gard. 23: 636-655.
- Zhuang W-Y (1998): A list of Discomycetes in China. *Mycotaxon* 67: 365-390.
- International Subcommission on Fungal Barcoding (2007): All Fungi Barcoding – online website (<http://www.allfungi.org/>)